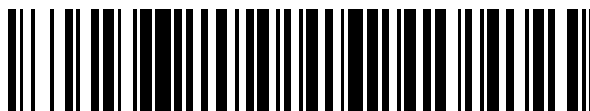


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 153**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2011 PCT/EP2011/066241**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2012 WO12045569**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2011 E 11761051 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2624859**

54 Título: **Factor II solo o en combinación con factores adicionales para el tratamiento de la hemostasia alterada asociada con una coagulopatía por dilución**

30 Prioridad:

06.10.2010 US 390224 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.07.2017

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building Granta Park
Cambridge, Cambridgeshire CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

**LOVGREN, ANN y
HANSSON, KENNY**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 625 153 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Factor II solo o en combinación con factores adicionales para el tratamiento de la hemostasia alterada asociada con una coagulopatía por dilución

- 5 Antecedentes
- Campo
- 10 La presente divulgación se refiere al tratamiento de la hemostasia alterada asociada con una coagulopatía por dilución.
- Descripción de la técnica relacionada
- 15 La hemostasia se refiere al proceso de detención la pérdida de sangre de un vaso sanguíneo dañado. La coagulación, o formación de coágulos sanguíneos, es una parte importante de la hemostasia. Para detener la hemorragia de una herida, se cubre la pared dañada del vaso sanguíneo con un coágulo que contiene plaquetas y fibrina. Los trastornos de la coagulación pueden conducir a un mayor riesgo de sangrado (hemorragia) o coagulación (trombosis).
- 20 La hemorragia masiva o la transfusión en pacientes se asocia comúnmente con la alteración de la coagulación. Dicha alteración de la coagulación puede estar causada por la coagulopatía por dilución, definida como una mayor tendencia a la hemorragia debido a la dilución de la sangre. La compensación de líquidos es un tratamiento convencional de la pérdida abundante de sangre para normalizar la presión sanguínea y evitar el shock circulatorio.
- 25 Sin embargo, la compensación de líquidos diluye los factores de coagulación del resto de la sangre y afecta a su función, lo que puede dar lugar a un aumento de la hemorragia que podría poner en peligro la vida.
- Las vías bioquímicas *in vivo* que conducen a la coagulación son complejas y requieren un gran número de factores y cofactores. Hay diez factores designados por números romanos I-XIII, siendo III, IV y VI designadores no usados.
- 30 Numerosos factores y cofactores relacionados modulan la actividad de la vía bioquímica. Por ejemplo, en la vía del factor tisular, tras dañarse el vaso sanguíneo, el factor VII (abreviado como FII por convención para los factores denominados con números romanos) entra en contacto con el factor tisular (TF) expresado en las células portadoras de factor tisular (fibroblastos estromales y leucocitos). Esto forma un complejo activado (TF-FVIIa). El TF-FVIIa activa el FIX y FX. El FVII es activado por la trombina, el FXIa, la plasmina, el FXII y el FXa. La conversión de FX en FXa
- 35 activado por el TF-FVIIa es inhibida casi de inmediato por el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). El FXa y su cofactor FVa forman el complejo protrombinasa, que activa la protrombina en trombina. La trombina activa entonces otros componentes de la cascada de coagulación, incluyendo el FV y el FVIII (que activa el FXI que, a su vez, activa el FIX), y activa y libera el FVIII de su unión con el factor de von Willebrand (vWf). El FVTIIa es el cofactor de FIXa, y juntos forman el complejo "tenase", que activa el FX para retroalimentarse positivamente en el ciclo. La activación de
- 40 la vía produce una ráfaga de trombina activada. La trombina activada en este ciclo puede convertir el fibrinógeno en fibrina, que es la proteína que forma un coágulo junto con las plaquetas.
- La protrombina (FII) se produce en el hígado y se modifica tras la traducción en una reacción dependiente de la vitamina K que convierte diez ácidos glutámicos de la protrombina en ácido gamma carboxi glutámico. La deficiencia
- 45 de vitamina K o la administración del anticoagulante warfarina inhibe la conversión de los restos de ácido glutámico del Factor II en Gla, lo que ralentiza la activación de la cascada de la coagulación. La trombina (FIIa) se produce por escisión enzimática de dos sitios de VII por el Factor X activado (FXa). La actividad de FXa se mejora en gran medida mediante la unión al Factor V activado (FVa). En adultos humanos, el nivel sanguíneo normal de actividad de protrombina se ha medido en torno a 1,1 unidades/ml. Los niveles plasmáticos de protrombina en los recién nacidos aumentan de manera constante tras el nacimiento para alcanzar niveles normales de adultos, desde un nivel de aproximadamente 0,5 unidades/ml un día después del nacimiento a un nivel de aproximadamente 0,9 unidades/ml tras 6 meses de vida.
- 50 La trombina, que se forma a partir de la protrombina, tiene muchos efectos en la cascada de la coagulación. Es una serina proteasa que convierte el fibrinógeno soluble en cadenas insolubles de fibrina, así como cataliza muchas otras reacciones relacionadas con la coagulación. Al Dieri *et al.*, investigaron la relación entre las concentraciones del factor de coagulación, los parámetros de generación de trombina y la cantidad de pérdida de sangre en pacientes con diversas deficiencias congénitas de factor de coagulación. Los autores demostraron que la tendencia a la hemorragia se asoció directamente con la cantidad de generación de trombina, que varió de manera lineal a las
- 55 concentraciones de FII. Al Dieri *et al.*, *Thromb Haemost* 2002, 88: 576- 82. Fenger-Erikson *et al.*, también mostraron, en el caso de la coagulopatía por dilución, que aparte del fibrinógeno, los factores de coagulación incluyendo el FII, FX y FXIII también se redujeron por debajo del nivel esperado tras una dilución al 32 % con solución de almidón hidroxietílico. Fenger-Eriksen *et al.*, *J Thromb Haemost* 2009, 7: 1099-105.
- 60 El fibrinógeno (factor I o FI) es una glicoproteína plasmática soluble que es sintetizada por el hígado y convertida por la trombina en fibrina durante la coagulación de la sangre. Los procesos de la cascada de coagulación convierten la
- 65

protrombina en la serina proteasa activada trombina, que convierte el fibrinógeno en fibrina. La fibrina es entonces reticulada por el factor XIII para formar un coágulo. La concentración normal de fibrinógeno en el plasma sanguíneo es de 1,5-4,0 g/l o de aproximadamente 7 µM. En el caso de una pérdida de sangre marcada, el fibrinógeno más que cualquier otro factor procoagulante o plaqueta alcanza concentraciones en plasma críticamente bajas. Hiippala *et al.*, *Anesth Analg* 1995, 81:360-5; Singbartl *et al.*, *Anesth Analg* 2003, 96:929-35; McLoughlin *et al.*, *Anesth Analg* 1996, 83:459-65. Pequeñas cantidades de coloides (inferiores a 1.000 ml) pueden afectar a la polimerización de la fibrina y, por lo tanto, la fuerza del coágulo. Lunerhofer P *et al.*, *Anesth Analg* 2002, 95:858-65; Mittermayr *et al.*, *Anesth Analg* 2007; 105:905-17; Fries *et al.*, *Anesth Analg* 2002,94:1280-7. Algunas recomendaciones citan un umbral de concentración de fibrinógeno de 1 g/l basado en los resultados de un estudio en el que se observó que cuatro de cada cuatro pacientes con una concentración de fibrinógeno inferior a 0,5 g/l tenían hemorragia microvascular difusa. Spahn *et al.*, *CritCare* 2007, 11:R17; Stainsby *et al.*, *Br J Haematol* 2006; 135:634-41; Ciavarella *et al.*, *Br J Haematol* 1987; 67:365-8. Por el contrario, los datos clínicos recientes de la hemorragia periparto, la neurocirugía y la cirugía cardíaca muestran que a una concentración de fibrinógeno inferior a 1,5-2 g/l, ya hay una tendencia creciente de hemorragia peri y postoperatoria. Charbit *et al.*, *J Thromb Haemost* 2007, 5:266-73; Gerlach *et al.*, *Stroke* 2002, 33:1618-23; Blome *et al.*, *J Thromb Haemost* 2005, 93:1101-7; Ucar *et al.*, *Heart Surg Forum* 2007, 10:E332-6.

Los problemas de coagulación asociados con trastornos hemorrágicos tales como la coagulopatía por dilución se pueden abordar con terapia hemostática. El objetivo de la terapia hemostática es reducir al mínimo la pérdida de sangre, las necesidades de transfusión y la mortalidad. En pacientes con traumatismos con puntuaciones de gravedad de lesiones (ISS) idénticas, la mortalidad prácticamente se duplica simplemente como resultado de la coagulopatía. Brohi *et al.*, *J Trauma* 2003, 54: 1127-30. La hemorragia masiva o la transfusión masiva en pacientes con politraumatismo se asocia con una coagulación alterada. Por lo tanto, para lograr una hemostasia adecuada, se requiere una cantidad suficiente de trombina y suficiente sustrato coagulable. Los elementos clave en la coagulación son la formación de trombina en la superficie de las plaquetas y la escisión del fibrinógeno por la trombina para formar fibrina. Brohi *et al.*, *J Trauma* 2003, 54:1127-30. Si se forma suficiente trombina, convierte el fibrinógeno en fibrina estable, lo que determina la firmeza del coágulo en desarrollo en presencia del factor XIII (FXIII). Korte *et al.*, *Hamostaseologie* 2006, 26: S30-5.

Un reemplazo agresivo del líquido es crucial en el caso de la pérdida de sangre masiva, en pacientes con traumatismo por un objeto romo y politraumatismo, para mantener la normovolemia. Sperry J. L., *et al.*, *J Trauma* 2008; 64: 9-14. Sin embargo, la estabilización hemodinámica mediante la administración de grandes cantidades de soluciones cristaloides o coloides provoca LA coagulopatía por dilución. Los efectos clínicos de la alteración de la coagulación plasmática causada por hemodilución normovolémica se investigaron previamente en varias publicaciones. Innerhofer P., *et al.*, *Anesth Analg* 2002; 95:858-65, Singbartl *et al.*, *Anesth Analg* 2003; 96:929-35. Mittermayr *et al.*, *Anesth Analg* 2007; 105:905-17.

La coagulopatía por dilución suele tratarse con plasma recién congelado (FFP) y, si está disponible, con crioprecipitado. Stainsby *et al.*, *Br J Anaesth* 2000, 85:487-91; Spahn *et al.*, *Crit Care* 2007, 11:R17. Sin embargo, las concentraciones de factor de coagulación reducidas drásticamente apenas se pueden corregir administrando FFP debido a sus bajas concentraciones de factores de coagulación y sus efectos de expansión del volumen, que contrarrestan el aumento previsto de la concentración de cualquier proteína de interés. Mittermayer 2007, *supra*; Scalea *et al.*, *Ann Surg*, 2008, 248:578-84; Chowdhury *et al.*, *Br J Haematol* 2004, 125:69-73; Stanworth *et al.*, *Br J Haematol* 2004, 126:139-52; Abdel-Wahab *et al.*, *Transfusion* 2006, 46:1279-85. Además, la administración de FFP se asocia con varias complicaciones tales como la aparición de lesión pulmonar, insuficiencia multiorgánica e infección. Watson G. A., *et al.*, *J Trauma* 2009, 67:221-7; Sarani *et al.*, *Crit Care Med* 2008, 36:1114-8; Dara *et al.*, *Crit Care Med*. 2005, 33:2667-71. Además, el proceso de descongelación necesario retrasa el tratamiento inmediato, que es de especial importancia en el caso de hemorragia aguda y grave.

El efecto de la administración de concentrado de fibrinógeno en la coagulopatía por dilución se examinó previamente *in vitro*, en varios modelos animales, así como en la práctica clínica. Fries *et al.*, *Br J Anaesth* 2005, 95:172-7; Fries *et al.*, *Anesth Analg* 2006, 102:347-51; Velik-Salchner *et al.*, *J Thromb Haemost* 2007, 5:1019-25; Stinger *et al.*, *J Trauma* 2008, 64:S79-85. La administración de solo concentrado de fibrinógeno normaliza la resistencia del coágulo, pero no el inicio de la coagulación, ya que se trata de una reacción dependiente de la trombina. Fries *et al.*, *Br J Anaesth* 2005, 95:172-7; Fries *et al.*, *Anesth Analg* 2006, 102:347-51; Fenger-Eriksen *et al.*, *J. Thromb Haemost* 2009, 7:795-802. De este modo, se han estudiado anteriormente combinaciones de fibrinógeno y complejos de factor de coagulación tales como concentrado de complejo de protrombina (PCC).

En particular, Fries *et al.*, estudiaron el efecto de la sustitución del fibrinógeno en la reversión de la coagulopatía por dilución en un modelo *in vitro*. *British Journal of Anesthesia*, 2006, 97(4):460-467. Se diluyó sangre de 5 voluntarios varones sanos en un 60 % usando solución de Ringer con lactato, solución de gelatina modificada al 4 % o almidón de hidroxietilo al 6 % (HES) 130/0,4, así como la combinación de la solución de Ringer con lactato bien con cualquiera de 2 soluciones coloidales. Fries *et al.*, *Anesth Analg*; 2006, 102:347-51. Tras ello, se incubaron alícuotas de muestras de sangre diluidas con 3 concentraciones diferentes de fibrinógeno (0,75, 1,5 y 3,0 g/l). Las mediciones se realizaron mediante tromboesograma modificado (ROTEM[®], Pentapharm, Munich, Alemania). Después de una dilución al 60 %, los tiempos de coagulación aumentaron, mientras que la firmeza del coágulo y la polimerización de

la fibrina se redujeron significativamente. Tras la administración de fibrinógeno, los tiempos de coagulación se redujeron. La firmeza del coágulo, así como la polimerización de la fibrina, aumentaron en todas las muestras de sangre diluidas cuando se añadió fibrinógeno. El efecto de la sustitución *in vitro* de fibrinógeno sobre las variables de ROTEM® dependía de la dosis de fibrinógeno y del tipo de solución usada para diluir las muestras de sangre.

En otro estudio, Fries *et al.*, investigaron el efecto del concentrado de complejo de fibrinógeno y protrombina (PCC) en condiciones de hemodilución y hemorragia no controlada en un modelo porcino. Fries *et al.*, *British Journal of Anaesthesia*, 2006, 97(4): 460-467. Después de una importante pérdida de sangre del 65 % del volumen sanguíneo total estimado, el reemplazo del volumen de líquido con HES (2.500 ml) dio lugar a la coagulopatía por dilución medida mediante pruebas convencionales de coagulación y análisis de ROTEM®. En los animales que solo recibieron concentrado de glóbulos rojos recuperados y en el grupo de placebo, hubo una pequeña mejoría estadísticamente significativa en los parámetros de ROTEM®. Sin embargo, en el grupo de tratamiento, la sustitución adicional de fibrinógeno y PCC produjo la normalización de los parámetros de coagulación. La pérdida de sangre y la mortalidad tras una lesión hepática estandarizada se redujeron significativamente en animales tratados con fibrinógeno y PCC en comparación con el placebo.

El PCC se suele administrar en la práctica clínica en el caso de un tiempo de coagulación prolongado en pacientes en estado crítico, así como en situaciones de hemorragia masiva. Schochl *et al.*, *Anaesthesia* 2009, 58(10): 1010-1026. El PCC corresponde a los factores 11, VII, IX y X, así como a la proteína C y pequeñas cantidades de heparina, y se ha usado durante años para tratar las deficiencias hereditarias de la coagulación y para la reversión de la anticoagulación tras la administración de antagonistas de la vitamina K. Solo se dispone de datos limitados en animales sobre el uso de preparados de PCC modernos en cerdos que presentan deficiencias adquiridas del factor de coagulación causadas por la pérdida masiva de sangre y la administración de HES. Dickneite *et al.*, *Anesth Analg* 2008, 106:1070-7; Dickneite *et al.*, *Br J Anaesth* 2009, 102:345-54; Dickneite *et al J Trauma* 2009.

Staudinger *et al.*, investigaron el efecto del PCC en la coagulación plasmática en pacientes en estado crítico, e indicaron que una dosis de 2.000 unidades de Factor IX de PCC (media de 30 UI/kg de peso corporal) normalizó el tiempo de protrombina (PT) elevando el nivel plasmático de factores de coagulación II, VII, IX y X en pacientes con actividad de coagulación moderadamente reducida. Staudinger *et al.*, *Intensive Care Med* 1999, 25:1105-10. Sin embargo, con respecto a la generación de trombina, el PCC parece ser mucho más activo que el rhFVIIa. Dickneite *et al.*, *J Trauma* 2009. El PCC puede estar asociado con un mayor riesgo de complicaciones tromboembólicas, especialmente, en pacientes con defectos de coagulación adquiridos. Bagot *et al.*, *Thromb Haemost* 2007, 98:1141-2; Warren *et al.*, *Ann Emerg Med* 2009, 53:758-61; Kohler *et al.*, *Thromb Haemost* 1998, 80:399-402.

También se han propuesto diversos métodos adicionales para el tratamiento de la hemorragia y la pérdida de sangre, incluyendo la suplementación de factores de coagulación. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes de EE.UU. 2003/0129183, 2004/0198647, 2004/0237970, 2005/0282771, 2006/0025336, 2006/0211621, 2007/0232788, 2008/0014251, 2008/0188400, 2008/0267940, 2010/0093607, 2009/0098103, 2009/0148502, 2009/0175931, 2009/0232877 y 2010/0086529.

A pesar de la propuesta y del estudio de diversas composiciones y métodos para restaurar la hemostasia, sigue existiendo la necesidad en la técnica de mejorar los métodos de tratamiento de trastornos hemostáticos tales como la coagulopatía por dilución.

Para lograr la hemostasia en pacientes con trastornos hemorrágicos o pérdida de sangre, se requiere una cantidad suficiente de trombina y suficiente sustrato coagulable (fibrinógeno). Los aspectos clave en la coagulación son la formación de trombina en la superficie de las plaquetas y la escisión del fibrinógeno por trombina para formar fibrina. Si se forma suficiente trombina, convierte el fibrinógeno en fibrina estable, siempre que haya fibrinógeno, lo que determina la firmeza del coágulo en desarrollo en presencia del factor XIII (FXIII).

La presente invención proporciona el tratamiento o la reducción al mínimo de la hemorragia incontrolada usando uno o varios agentes hemostáticos recombinantes, incluyendo el factor II humano recombinante (rhFII) solo o una combinación de tres factores de coagulación humanos recombinantes, rhFII, rhFX y rhFVIIa (3F), donde se usan agentes hemostáticos con o sin fibrinógeno. En particular, la presente invención demuestra la eficacia de dichos agentes hemostáticos recombinantes en el tratamiento de la coagulopatía por dilución. Sorprendentemente, la administración de rhFII solo o en combinación con fibrinógeno basta para restablecer la hemostasia normal. La administración de rhFII solo, o en combinación con fibrinógeno, puede evitar las complicaciones potencialmente graves de los episodios tromboembólicos que pueden acompañar a otras formas convencionales de tratamiento proporcionadas en la actualidad para controlar los trastornos hemorrágicos o la pérdida de sangre.

Cabe señalar que la referencia a cualquiera de las publicaciones en el presente documento no debe interpretarse como una admisión de que dicha publicación sea una técnica anterior a las invenciones desveladas a continuación en el presente documento.

Resumen

El tratamiento de un trastorno hemostático o la normalización de la hemostasia asociada con una coagulopatía por dilución pueden comprender administrar un tratamiento mediante factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste en (1) FII solo; (2) FII y FVIIa; y (3) una combinación de tres factores de FII, FX y FVIIa. El tratamiento mediante factor de coagulación (agente/s hemostático/s) se puede administrar opcionalmente en combinación con fibrinógeno. El/los agente/s hemostático/s puede/n ser factores humanos recombinantes, por ejemplo, rhFII, rhFX y rhVIIa (esta combinación de tres factores de factores humanos recombinantes se puede abreviar como 3F) o rhFII solo. En algunas realizaciones, un tratamiento eficaz de un trastorno hemostático o de la normalización de la hemostasia asociada con una coagulopatía por dilución puede comprender la administración conjunta de fibrinógeno y rhFII. El tratamiento puede realizarse sin suplementación sustancial de ningún otro factor de coagulación. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un tratamiento eficaz de un trastorno hemostático asociado con la coagulopatía por dilución puede comprender administrar un tratamiento mediante factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste en (1) FII solo, por ejemplo, rhFII; (2) 3F; y (3) FII y FVIIa; (4) fibrinógeno y una combinación de FII, FVIIa y FX; (5) fibrinógeno, FII y FVIIa; (6) o fibrinógeno y FII

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Pérdida de sangre por kg de peso corporal en ml tras una incisión hepática y la administración de control de solución salina, concentrado de fibrinógeno (fib), concentración de fibrinógeno en combinación con PCC (PCC + fib), concentrado de fibrinógeno en combinación con combinación de tres factores (3F+fib) o concentrado de fibrinógeno en combinación con FII humano recombinante (FII + fib), que se muestra como la media \pm DT.

Figura 2 (A-B): Análisis de ROTEM[®] en la línea basal (LB), tras la extracción de sangre (ES), tras la hemodilución (TH), tras la administración del fármaco de estudio (FE), y en el punto final de la observación (FIN). Los fármacos del estudio corresponden a concentrado de fibrinógeno (fibrinógeno), concentración de fibrinógeno en combinación con PCC (PCC), concentrado de fibrinógeno en combinación con FII humano recombinante (FII), concentrado de fibrinógeno en combinación con combinación de tres factores (3F) o control de solución salina. Se muestran el tiempo de coagulación (TC, en segundos) (Figura 2A) y la máxima firmeza del coágulo (FMC, en mm) (Figura 2B). Se muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) en comparación con el grupo de solución salina y el grupo de fibrinógeno.

Figura 3: Pérdida de sangre por kg de peso corporal en ml tras la administración de (1) control de solución salina; (2) FII humano recombinante (rhFII) a 8 mg/kg; (3) combinación de tres factores correspondiente a rhFII + rhFX + rhFVIIa a 4,0, 0,32 y 0,006 mg/kg, respectivamente (dosis baja); (4) combinación de tres factores correspondiente a rhFII + rhFX + rhFVIIa a 8,0, 0,64 y 0,012 mg/kg, respectivamente (dosis alta); (5) FEIBA VH[®] (concentrado de complejo activado (APCC), Baxter) a 40 U/kg; (6) NovoSeven[®] (factor de coagulación VIIa; Novo Nordisk) a una primera dosis de 200 μ g/kg seguida de una segunda dosis de 100 μ g/kg una hora después; O Haemocompletan[®] HS (concentrado de fibrinógeno, CSL-Behring), como valores individuales y mediana (barra horizontal).

Figura 4 (A-B): Resultados de ROTEM tras la administración de factores de coagulación, o combinaciones de los mismos, como se describe en la Figura 3 anterior, que muestra a) tiempo de coagulación (TC); b) firmeza máxima del coágulo (FMC) de muestras de sangre entera activadas por ex-TEM (factor tisular) extraídas al inicio, tras la dilución, tras la administración del fármaco y al final del experimento, respectivamente, mostradas como media \pm DT.

Figura 5 (A-D): Resultados de generación de trombina (trombografía calibrada automatizada) tras la administración de factores de coagulación, o combinaciones de los mismos, según lo descrito en la Figura 3 anterior, que muestra (A) tiempo de retardo; (B) tiempo hasta el máximo; (C) máximo; y (D) potencial de trombina endógena para las muestras de plasma obtenidas al inicio, tras la dilución, tras la administración del fármaco y al final del experimento, mostradas como media \pm ETM.

Figura 6. Concentración del complejo de trombina-antitrombina en muestras de plasma tras la administración de factores de coagulación, o combinaciones de los mismos, según lo descrito para la Figura 3 anterior, representada al inicio, tras la dilución, tras la administración del fármaco y al final del experimento mostrada como la mediana.

Descripción detallada

La presente invención proporciona el tratamiento de la hemorragia incontrolada o la normalización de la hemostasia asociada con una coagulopatía por dilución mediante la administración de un tratamiento mediante factor de coagulación o una combinación de uno o más factores de coagulación. En particular, la invención proporciona el tratamiento de la hemorragia incontrolada o la normalización de la hemostasia asociada con una coagulopatía por dilución mediante la administración de FII, o VII y FVIIa, o una combinación de tres factores (FII, FX y FVIIa). En ciertas realizaciones, los agentes hemostáticos o factores de coagulación son factores de coagulación humanos recombinantes. En realizaciones adicionales, los factores de coagulación se administran con o sin fibrinógeno. También se desvela a efectos meramente ilustrativos el PCC (FII, FVII, FIX y FX, opcionalmente con pequeñas cantidades de heparina) como tratamiento mediante factor de coagulación.

El inicio de la coagulopatía por dilución y el efecto del tratamiento se pueden medir mediante pruebas de coagulación convencionales, tales como la trombelastometría rotacional (ROTEM[®]) y generación de trombina medida mediante la trombografía calibrada automatizada (CAT) realizado usando activador de TF 1 pM.

- 5 ROTEM[®] investiga la interacción de factores de coagulación, sus inhibidores, fármacos anticoagulantes, células sanguíneas, en concreto, plaquetas, durante la coagulación y posterior fibrinólisis. Las condiciones reológicas imitan el flujo lento de la sangre por las venas. En resumen, se dispone la sangre en una cubeta desechable usando una pipeta electrónica. Se coloca un pasador desechable a un eje que está conectado con un resorte delgado y que oscila lentamente hacia adelante y hacia atrás. La señal del pasador suspendido en la muestra de sangre se transmite a través de un sistema detector óptico. El instrumento mide y muestra gráficamente los cambios en la elasticidad en todas las etapas del coágulo en desarrollo y resolución. La temperatura de ensayo típica es de 37 °C, pero se pueden seleccionar diferentes temperaturas. El resultado principal es una curva de reacción que muestra la elasticidad a lo largo del tiempo cuando el coágulo se forma o se disuelve.
- 10
- 15 Cuatro parámetros describen la curva de coagulación en el uso rutinario. El tiempo de coagulación (TC) es el tiempo de retardo desde la adición del reactivo de partida a la sangre hasta que el coágulo comienza a formarse. La prolongación del TC puede deberse a deficiencias de coagulación, principalmente factores de coagulación, o heparina (dependiendo de la prueba usada). Un acortamiento del TC indica hipercoagulabilidad. El ángulo alfa es el ángulo de una tangente a la curva, mientras que el tiempo de formación de coágulos (TFC) es el tiempo desde el TC hasta que se alcanza una firmeza del coágulo de 20 mm. Estos parámetros indican la velocidad a la que se forma un coágulo sólido, y están influidos principalmente por la función plaquetaria, pero también contribuyen factores de fibrinógeno y coagulación. Un TFC prolongado (o un ángulo alfa inferior) suele deberse a una mala función plaquetaria, bajo recuento de plaquetas, trastornos de polimerización de fibrina o deficiencia de fibrinógeno. Un acortamiento del TFC (o un alto ángulo alfa) indican hipercoagulabilidad. La máxima firmeza del coágulo (FMC) es la mayor amplitud vertical del trazado. Refleja la resistencia absoluta de la fibrina y del coágulo plaquetario. Un FMC bajo es indicativo de una reducción del número o de la función de las plaquetas, una reducción del nivel de fibrinógeno o trastornos de polimerización de la fibrina, o una baja actividad del factor XIII. Un coágulo mecánicamente débil representa un grave riesgo de hemorragia.
- 20
- 25
- 30 Se pueden usar variaciones de ROTEM[®] para enfatizar diferentes parámetros y efectos. Por ejemplo, EXTEM es un ensayo de detección para el sistema de hemostasia (extrínseco). El reactivo EXTEM activa suavemente la hemostasia usando el factor tisular. El resultado se ve influido luego por factores de coagulación extrínsecos, plaquetas y fibrinógeno.
- 35 La trombografía calibrada automatizada (CAT) ha sido descrita por Hemker *et al.*, (*Pathophysiol Haemost Thromb*, 2002, 32:249-253). Usando un sustrato de trombina fluorogénico "lento" y una comparación continua con un calibrador de ejecución simultánea, se puede controlar automáticamente la generación de trombina. La "trombografía" resultante mide la hipocoagulabilidad y la hipercoagulabilidad en plasma pobre en plaquetas.
- 40 El tratamiento de un trastorno hemostático o la normalización de la hemostasia asociada con una coagulopatía por dilución pueden comprender la administración de un tratamiento mediante factor de coagulación, por ejemplo, FII y, opcionalmente, FX y FVIIa, o una combinación de fibrinógeno y FII, opcionalmente además en combinación con FX y FVIIa. El/los agente/s hemostático/s puede/n ser factores humanos recombinantes, por ejemplo, rhFII, rhFX y rhFVIIa o rhFII solo. En algunas realizaciones, un tratamiento eficaz de un trastorno hemostático puede consistir en administrar VII o administrar conjuntamente FII, FX y FVIIa, o administrar conjuntamente fibrinógeno con FII y opcionalmente, administrar conjuntamente además FX y FVIIa, pudiendo ser FII, FX y/o FVIIa factores humanos producidos de forma recombinante.
- 45
- 50 El tratamiento o la normalización o la hemostasia asociada con una coagulopatía por dilución se pueden realizar sin la suplementación sustancial de ningún otro factor de coagulación. En algunas realizaciones, el tratamiento de un trastorno hemostático puede consistir en VII o la administración conjunta de fibrinógeno y FII, donde el VII puede ser FII humano recombinante (rhFII).
- 55 La expresión "suplementación sustancial" se refiere a la adición de otros componentes tales como factores de coagulación además de los descritos en la presente invención, en una cantidad en la que el efecto de uno o más agentes hemostáticos cuando se suplementan con dichos factores de coagulación adicionales es considerablemente diferente del efecto de la administración del uno o más agentes hemostáticos sin suplementación.
- 60 Como se usan en el presente documento, las proteínas "recombinantes" incluyen aquellas proteínas producidas mediante técnicas recombinantes. Dichas proteínas incluyen aquellas que se asemejan a la proteína natural, así como las modificadas para potenciar la actividad, la semivida de la proteína, la estabilidad de la proteína, la localización de la proteína y la eficacia. Véase la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2005/0164367.
- 65 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" es un método de obtención de resultados clínicos beneficiosos o deseados. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, el alivio de

los síntomas, la reducción de la hemorragia, la estabilización del individuo y la prevención de la hemorragia.

La expresión "que consiste esencialmente en" no implica la abstención de otros tratamientos de pacientes convencionales simultáneos, sino que un tratamiento que consiste esencialmente en, por ejemplo, la administración de FII o la administración conjunta de una cantidad eficaz de fibrinógeno y FII, no está precedido de inmediato, acompañado ni seguido de inmediato por una suplementación significativa de otros factores de coagulación, en particular, factores de coagulación de proteínas tales como los designados por los números romanos V-XIII. En algunas realizaciones, un tratamiento que consiste esencialmente en la administración de FII solo o la administración conjunta de una cantidad eficaz de fibrinógeno y FII, puede realizarse simultáneamente con procedimientos separados tales como transfusión, administración de plaquetas congeladas, recuperación de células sanguíneas, fluidos que contienen cristaloideos y/o coloides, y otros tratamientos convencionales que no comprenden la suplementación activa de factores de coagulación más allá de lo que puede ser endógeno en sangre transfundida, preparados de plaquetas congeladas, o similares. En otras realizaciones, puede no ser necesario o desearse realizar simultáneamente cualquier procedimiento que comprenda la administración separada de una composición que incluya cantidades significativas de factores de coagulación (por ejemplo, factores V-XIII) al realizar un tratamiento que consista esencialmente en la administración de una cantidad eficaz de FII, 3F, fibrinógeno y FII o fibrinógeno y 3F.

Un método de tratamiento de un trastorno de hemorragia por traumatismo en un mamífero que lo necesita puede comprender administrar un tratamiento mediante factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste en rhFII, rhFVIIa y rhFX; y (b) rhFII solo, en el que (a), o (b) se proporciona opcionalmente en combinación con fibrinógeno. En algunas realizaciones, un método de normalización de la hemostasia alterada asociada con un trastorno de hemorragia por traumatismo en un mamífero puede comprender administrar el tratamiento con el factor de coagulación que consiste en (a) FII y FVIIa; (b) rhFII, rhFVIIa y rhFX; y (c) rhFII solo, en el que (a), (b) o (c) se proporciona opcionalmente en combinación con fibrinógeno. Además, un método de reducción de la mortalidad resultante de un trastorno de hemorragia traumático puede comprender administrar un tratamiento mediante factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste en (a) PCC (FII, FX, FIX, FVII y proteína C); (b) rhFII, rhFVIIa y rhFX; y (c) rhFII solo, en el que (a), (b) o (c) se proporciona opcionalmente en combinación con fibrinógeno.

Un método de tratamiento de un trastorno hemostático o de normalización de la hemostasia asociada con una coagulopatía por dilución puede comprender aumentar la firmeza máxima del coágulo (FMC), reducir el tiempo de coagulación (TC) y/o mejorar la generación de trombina tras una hemorragia o pérdida masiva de sangre asociada con un trastorno de hemorragia por traumatismo en un mamífero mediante la administración de terapia de combinación que comprenda, o que consista esencialmente en, uno o más agentes hemostáticos incluyendo VII y, opcionalmente, fibrinógeno.

En cualquiera de estos métodos, el tratamiento mediante factor de coagulación puede consistir en (a) rhFII, rhFVIIa y rhFX; y (b) rhFII. En una realización, el tratamiento mediante factor de coagulación es una combinación de FII, FVIIa y FX. En otra realización, el tratamiento mediante factor de coagulación es VII o rhFII solo. En otras realizaciones, el tratamiento mediante factor de coagulación puede ser bien una combinación de rhFII, rhFVIIa y rhFX o rhFII solo, esencialmente sin la suplementación de cualquier otro factor hemostático, en particular, otros factores de coagulación denominados con números romanos. Es decir, en algunas realizaciones, los métodos pueden comprender administrar rhFII y, opcionalmente, fibrinógeno esencialmente sin la suplementación de cualquier otro factor hemostático, en particular, de factores V-XIII.

El método de tratamiento de un trastorno de hemorragia por traumatismo en un mamífero que lo necesita puede consistir en administrar un tratamiento mediante factor de coagulación como se ha descrito anteriormente. Del mismo modo, un método de normalización de la hemostasia alterada asociada con un trastorno de hemorragia por traumatismo en un mamífero puede consistir en administrar un tratamiento mediante factor de coagulación como se ha descrito anteriormente. Además, un método de reducción de la mortalidad resultante de un trastorno de hemorragia por traumatismo puede consistir en administrar un tratamiento mediante factor de coagulación como se ha descrito anteriormente. Un método de tratamiento de un trastorno hemostático o de normalización de la hemostasia asociada con una coagulopatía por dilución puede comprender aumentar la firmeza máxima del coágulo (FMC), reducir el tiempo de coagulación (TC) y/o mejorar la generación de trombina tras una hemorragia o pérdida masiva de sangre asociada con un trastorno de hemorragia por traumatismo en un mamífero mediante un método que puede consistir en administrar un tratamiento mediante factor de coagulación. En ciertas realizaciones, la firmeza máxima del coágulo se aumenta a aproximadamente 10 mm a aproximadamente 40 mm, a aproximadamente 10 mm a aproximadamente 30 mm, a aproximadamente 10 mm, a aproximadamente 15 mm, a aproximadamente 20 mm, a aproximadamente 25 mm o a aproximadamente 30 mm. En otras realizaciones, el tiempo de coagulación se reduce en aproximadamente 35 a aproximadamente 75 segundos, o en aproximadamente 35 segundos, en aproximadamente 40 segundos, en aproximadamente 45 segundos, en aproximadamente 50 segundos, en aproximadamente 55 segundos, en aproximadamente 60 segundos, en aproximadamente 65 segundos, en aproximadamente 70 segundos o en aproximadamente 75 segundos. Como anteriormente, el tratamiento mediante factor de coagulación, el tratamiento mediante factor de coagulación puede consistir en (a) FII y FVIIa; (b) rhFII, rhFVIIa y rhFX; y (c) rhFII solo, en el que (a), (b) o (c) se proporciona opcionalmente en combinación con fibrinógeno. En algunas realizaciones preferidas, el tratamiento mediante factor de coagulación es

una combinación de (1) FII, FVIIa y FX; o (2) FII solo. El tratamiento mediante factor de coagulación puede comprender factores humanos recombinantes, es decir, bien una combinación de (1) rhFII, rhFVIIa y rhFX; o (2) rhFII solo. En algunas realizaciones, los métodos pueden consistir en la administración conjunta de rhFII, y opcionalmente, la administración conjunta de fibrinógeno.

"Administración conjunta " o "tratamiento conjunto" significa administrar una mezcla de componentes o administrar por separado los componentes de un tratamiento conjunto en momentos que están próximos entre sí, por ejemplo, administrar los componentes administrados conjuntamente durante periodos que se solapan en el tiempo o comenzar la administración de un componente en aproximadamente una hora, o media hora, o cuarto de hora del comienzo o la finalización de la administración de un componente administrado conjuntamente.

Los componentes administrados en los métodos desvelados en el presente documento se formulan y administran usando técnicas que están bien establecidas en la materia. Por ejemplo, el fibrinógeno y FII, rhFII o 3F se pueden administrar por inyección o infusión intravenosa usando un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y excipientes adecuados para la formulación de los agentes activos incluyen cualquier agente farmacéutico que no induzca una respuesta inmune perjudicial para el individuo que recibe la composición y que pueda administrarse sin producir la toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, líquidos tales como agua, solución salina, glicerol, azúcares y etanol. También se pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables. Dichas sales incluyen sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Además, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento del pH, y similares, pueden estar presentes en dichos vehículos. Hay una descripción completa de excipientes farmacéuticamente aceptables disponible en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Pub. Co., 18ª edición, Easton, Pa., 1990).

Un trastorno hemostático puede estar asociado con cualquiera de entre una coagulopatía (por ejemplo, coagulopatía por dilución), hemorragia por traumatismo, hemorragia perquirúrgica, hemorragia postquirúrgica, hemorragia postparto y similares. Un trastorno hemostático puede estar asociado con un nivel de concentración de fibrinógeno en sangre inferior a aproximadamente 2 a aproximadamente 1,5 g/l, inferior a aproximadamente 1 g/l, o inferior a aproximadamente 0,5 g/l. El trastorno hemostático puede estar asociado con una pérdida de sangre del aproximadamente 30 % al aproximadamente 85 %, por ejemplo, más del aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 % o aproximadamente 85 % del volumen sanguíneo total estimado de un mamífero. En algunas realizaciones, la coagulopatía por dilución se produce como resultado del restablecimiento de la normovolemia o del restablecimiento de la estabilización hemodinámica. Así pues, un mamífero que necesita los tratamientos desvelados en el presente documento puede ser un mamífero que cumpla uno o más de estos criterios.

Los trastornos hemostáticos también pueden incluir hemofilia A y B, pacientes con hemofilia A y B con anticuerpos inhibidores, deficiencias en factores de coagulación, por ejemplo, fibrinógeno, FII, FV, FVII, FIX, FVIII, FX, FXI, FXII y FXIII, factor de von Willebrand, deficiencia combinada de FV/FVII, deficiencia de vitamina K epóxido reductasa C1, deficiencia de gamma-carboxilasa; hemorragia asociada con traumatismo, lesión, trombosis, trombocitopenia, apoplejía, coagulopatía, coagulación intravascular diseminada (DIC); sobre-anticoagulación asociada con la heparina, heparina de bajo peso molecular, pentasacárido, warfarina, antitrombóticos de molécula pequeña (es decir, inhibidores de FXa); y trastornos plaquetarios tales como el síndrome de Bernard Soulier, tromboclastemia de Glanzman y deficiencia de la reserva de almacenamiento.

Un trastorno hemostático también puede incluir hemorragia relacionada con trastornos trombóticos tales como trombosis venosa profunda, trombosis asociada con estados de enfermedad cardiovascular o neoplasias malignas, trombosis resultante de catéteres permanentes u otros procedimientos quirúrgicos invasivos y trombosis asociada con enfermedades autoinmunes tales como lupus.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender o consisten esencialmente en la administración conjunta de fibrinógeno en una cantidad suficiente para elevar la concentración de fibrinógeno en sangre por encima de aproximadamente 0,5, aproximadamente 1, aproximadamente 1,5 o aproximadamente 2 g/l. En algunas realizaciones, el fibrinógeno se administra a una dosis de 12,5-200 mg/kg, por ejemplo, a una dosis de, por ejemplo, aproximadamente 12,5, 25, 50 100 o 200 mg/kg. En algunas realizaciones, el rhFII se administra a una dosis de 1, 2, 4, 8 o 10 mg/kg. En algunas realizaciones, la administración conjunta de fibrinógeno y uno o más agentes hemostáticos da lugar al mantenimiento de la coagulación aproximadamente normalizada durante al menos dos horas después de la administración.

Los agentes activos para un tratamiento se pueden montar en un kit. El kit podría contener fibrinógeno y FII, rhFII y/o 3F, así como cualquier excipiente apropiado, tal como, pero sin limitación, solución salina y solución de sacarosa, y cualquier cofactor adicional para la estabilización o efectividad de los componentes de la composición, tales como, pero sin limitación, azúcares, antioxidantes y albúmina. Además, el kit puede comprender otros elementos implicados en el suministro de los agentes activos, incluyendo un dispositivo para la inyección de los agentes activos

(por ejemplo, una jeringa), un torniquete y un hisopo de alcohol para limpiar el sitio de inyección. También se pueden incluir otros elementos en un kit que incluye elementos para el cierre de heridas tales como material de sutura, agujas y fórceps.

5 Aunque los métodos desvelados en el presente documento se han descrito en detalle con referencia a realizaciones de los mismos, resultará evidente para un experto en la materia que se pueden realizar diversos cambios y equivalentes empleados, sin apartarse del alcance de la divulgación. Del mismo modo, los siguientes ejemplos se presentan como ilustrativos de los procedimientos desvelados, pero se han de interpretar como limitantes de los métodos desvelados.

10 Se puede administrar fibrinógeno o concentrado de fibrinógeno además de uno o más agentes hemostáticos para aumentar la resistencia del coágulo final. En ciertas realizaciones, la combinación de fibrinógeno con rhFII o 3F acorta el tiempo de coagulación y mejora la generación de trombina. La administración de rhFII combinada con fibrinógeno puede utilizarse para reducir la mortalidad en el tratamiento de la hemorragia no controlada. Se desvela
15 que se puede usar la administración de la combinación de PCC y fibrinógeno para reforzar la coagulación, hasta 0,5 horas, una hora o dos horas después de la administración. Por lo tanto, el uso de rhFII, en particular, en combinación con fibrinógeno, puede ser una alternativa al PCC con una eficacia comparable, pero con menos riesgo de complicaciones tromboembólicas.

20 Un tratamiento que comprende la administración conjunta de fibrinógeno y rhFII sin suplementación de otros agentes hemostáticos puede ser eficaz para normalizar la hemostasia alterada tras una pérdida sanguínea severa al menos tan alta como aproximadamente un 60 % de hemodilución con menos riesgo de complicaciones. También es eficaz la administración conjunta de fibrinógeno y rhFII que contiene 3F. Además, un tratamiento eficaz puede consistir
25 esencialmente en administrar rhFII o 3F con o sin suplementación de fibrinógeno.

25 Ejemplos

Ejemplo 1

30 MÉTODOS

Preparación y mediciones quirúrgicas: el estudio se realizó con cincuenta cerdos sanos. Se realizó la medicación
35 previa de los animales con azaperona (4 mg/kg IM, agente neuroléptico, Stresnil™, Janssen, Viena, Austria) y atropina (0,1 mg/kg IM) una hora antes de iniciarse el estudio. Se indujo la anestesia y se mantuvo con propofol (1-2 mg/kg IV). Para la inducción de la analgesia, se inyectó piritramida (30 mg, opioide con una semivida de ~4 a 8 horas, Dipidolor™, janssen, Viena, Austria). Para la relajación muscular, se inyectaron 0,2 mg/kg/h de pancuronio tras la anestesia endotraqueal. Después de la intubación, se insertó un catéter francés de 7,5 en la arteria femoral para la recogida de muestras de sangre y la medición continua de la presión arterial. Se insertaron dos catéteres
40 franceses de 7,5 en ambas venas femorales para la extracción de sangre, la administración de coloides y cristaloides, y la administración del fármaco de estudio. Se colocó un catéter de Swan-Ganz a través de la vena yugular derecha.

Protocolo experimental: se cubrió la necesidad basal de reemplazo de líquidos (4 ml/kg) durante todo el curso del
45 ensayo usando cristaloides (solución de lactato de Ringer). Para inducir la coagulopatía por dilución estandarizada, se realizó una hemodilución normovolémica con HES al 6 % 130/0,4 (Voluven®, Fresenius Co., Bad Homburg, Alemania): se extrajo sangre de los animales a través de los catéteres grandes y se reemplazó por coloide en una proporción de 1:1. Una vez completada la hemodilución, se procesó la sangre extraída en un sistema Cell Saver (Cats®, Fresenius, Viena, Austria), se concentró y se volvió a transferir para evitar la anemia hemodinámicamente relevante. La hemodilución normovolémica se completó cuando la coagulopatía resultante alcanzó un nivel crítico
50 determinado por ROTEM® y el uso del reactivo EXTEM: tiempo de coagulación (TC) > 100 s y firmeza máxima del coágulo (FMC) < 40 mm. Los animales fueron asignados aleatoriamente a 200 mg/kg de concentrado de fibrinógeno (Haemocompiettan IIS®, CSL-Behring) (grupo de fibrinógeno), 200 mg/kg de concentrado de fibrinógeno y 35 UI/kg de PCC (Beriplex®, CSL Behring, Marburg, Alemania) (grupo de PCC), 200 mg/kg de concentrado de fibrinógeno y 4 mg/kg de concentrado de rhFII (AstraZeneca R&D Mölndal, Suecia) (grupo de FII), 200 mg/kg de concentrado de
55 fibrinógeno y un concentrado de combinación de tres factores que incluía 4 mg/kg de RhFII, 0,32 mg/kg de rhFX y 0,006 mg/kg de rhFVIIa (AstraZeneca R&D Mölndal, Suecia) (grupo de 3F) o una cantidad igual de solución salina normal (grupo salino). La dosis de concentrado de fibrinógeno y PCC se basó en datos previamente publicados de experimentos con animales. Sperry *et al.* *J Trauma* 2008, 64:9-14; Innerhofer P. *et al.*, *Anesth Analg* 2002, 95:858-65.

60 Se indujo una lesión hepática estandarizada (12 cm de longitud y 3 cm de profundidad) usando un molde inmediatamente después de la administración de los factores de coagulación o de la combinación de factores de coagulación descritos anteriormente. El corte se realizó sobre el lóbulo derecho del hígado. El estudio se realizó con ocultación para el personal que realizó los exámenes de los tejidos, los ensayos de coagulación, la documentación
65 de la hemodinámica, la incisión del hígado o para los que participaron en la recogida y la medición de la pérdida de sangre.

Tras la incisión del hígado, se evaluó la pérdida sanguínea subsiguiente, así como el tiempo transcurrido hasta que los animales murieron debido a choque hemorrágico. Además de las mediciones trombelastométricas, se realizaron ensayos de coagulación convencionales (PT, aPTT, fibrinógeno, recuento de plaquetas), los parámetros para la coagulación activada (D-dímeros y TAT) y un ensayo de generación de trombina para estimar el potencial de formación de trombina (trombografía calibrada automatizada, CAT).

Dos horas después del traumatismo hepático, se sacrificaron los animales supervivientes con infusión de potasio. Se extirparon el corazón, el pulmón, partes de los intestinos y los riñones, y se evaluaron para determinar la aparición de trombosis microvascular.

Muestreo de sangre y métodos analíticos: se realizó un muestreo de sangre arterial en la línea basal (LB), tras la extracción de sangre (ES), tras la hemodilución (TH), terapia con los fármacos del estudio (FE) y 120 min después de la incisión hepática o inmediatamente antes de la muerte anticipada (FIN). Todas las muestras de sangre se extrajeron de la arteria femoral, por lo que se desecharon los primeros 5 ml de sangre. Se recogieron muestras de sangre para los análisis de ROTEM[®] y de coagulación en tubos de 3 ml que contenían 0,3 ml (0,106 mol/l) de citrato de sodio tamponado (pH 5,5) (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Se recogieron muestras de sangre para el recuento de las células sanguíneas en tubos de 2,7 ml que contenían 1,6 mg de EDTA/ml (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Se determinaron el tiempo de protrombina (TP), el tiempo parcial de tromboplastina (PTT-LA1), la concentración de fibrinógeno, la antitrombina (AT) y el complejo de trombina-antitrombina (TAT) mediante métodos de laboratorio convencionales usando las pruebas apropiadas de Dade Behring, Marburg, Alemania, y el coagulómetro de Amelung, Baxter, RU. Para las mediciones de dímero D, se usó el dímero D del ensayo 0020008500[®] (Instrumentation Laboratory Company, Lexington, EE.UU.). El recuento de células sanguíneas se realizó usando el contador Poch-100i[®] de Sysmex (Sysmex, Lake Zürich, IL, EE.UU.). Se usó tromboelastometría (ROTEM[®], Pentapharm, Munich, Alemania) para la evaluación funcional del sistema de coagulación. Para la aceleración y la mejor estandarización, se usó el reactivo EXTEM. Luddington, Clin Lao Haematol 2005, 27:81-90.

El ensayo de trombografía calibrada automatizada (CAT) se realizó en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Greiner microlon, en forma de U, de alta unión, EE.UU.). Se mezclaron muestras de plasma tratadas con citradas (80 μ l) y solución desencadenante (20 μ l) (reactivo de PPP bajo n.º de cat. TS31.00, Thrombinoscope, Maastricht, Países Bajos) que contenían 1 pM de TF en pocillos de muestra. Paralelamente, se analizó un calibrador (n.º de catálogo TS20.00, Thrombinoscope) mezclando 20 μ l de calibrador y 80 μ l de plasma porcino normal tratado con citrato combinado en pocillos acoplados a los pocillos de muestra. A continuación, se trasladó la placa a un fluorómetro (Ascent reader, Thermolabsystems OY, Helsinki, Finlandia) y se dispensaron con un instrumento 20 μ l de solución de FluCa (n.º de catálogo TS50.00, Thrombinoscope) que contenía sustrato fluorogénico y CaCl₂. Se midió la señal fluorogénica se midió a λ de 390 nm, λ em de 460 nm durante 60 min. La placa de 96 pocillos se mantuvo en un bloque de calentamiento a 37 °C durante la adición de los reactivos. El inicio de la actividad de trombina (tiempo de retardo), el tiempo hasta el máximo de la actividad de la trombina (thMáx), la actividad de trombina máxima (Máximo) y la actividad total de trombina, es decir, el potencial de trombina endógena (PTE) se calcularon usando el software Thrombinoscope (versión 3.0.0.29) de Thrombinoscope BV (Maastricht, Países Bajos).

Análisis estadístico: todos los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, 1L). Se usó la prueba de de Shapiro-Wilk para analizar la normalidad. Las variables no distribuidas normalmente se transformaron logarítmicamente para permitir el análisis paramétrico. Aplicando un procedimiento jerárquico, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para detectar los efectos globales de grupo y del tiempo ($p < 0,05$ se consideró significativo). En el caso de diferencias significativas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para detectar las diferencias entre los grupos. Se usó el procedimiento de Bonferroni-Holm para la corrección de comparaciones múltiples. $p < 0,005$ se consideró significativo. En el caso de diferencias significativas, se realizaron pruebas t pareadas dentro de pruebas t independientes entre los grupos. $p < 0,001$ se consideró significativo. La supervivencia entre los grupos se analizó usando métodos de Kaplan-Meier con la comparación de rango logarítmico (Mantel Cox) de la supervivencia acumulada por grupo de tratamiento.

RESULTADOS

Se examinaron 50 cerdos con un peso medio de 36,98 kg (\pm 4,23) y una edad de entre cuatro y cinco meses. Al inicio, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto a los parámetros hemodinámicos ni los parámetros de coagulación, el recuento de plaquetas o de glóbulos rojos. Todos los resultados de las pruebas de coagulación estaban dentro del intervalo normal. Velik-Salchner *et al.* *Thromb Res* 2006, 117:597-602.

Tiempo de supervivencia: los animales tratados con fibrinógeno combinado con rhFII ($p = 0,029$) o con PCC ($p = 0,17$) vivieron significativamente más tiempo tras la lesión hepática con hemorragia no controlada que los del grupo de control. Todos los grupos de animales tratados con al menos un factor sanguíneo tuvieron un aumento de los tiempos de supervivencia en comparación con el grupo de control, mientras que el fibrinógeno solo y la combinación de fibrinógeno con 3F mostraron un efecto similar sobre la supervivencia tras la lesión hepática en comparación con el grupo de control. Un animal murió debido a una complicación tromboembólica inmediatamente después de la

administración de PCC.

Pérdida de sangre: como se muestra en la Figura 1, tras una lesión hepática con hemorragia no controlada, la pérdida de sangre disminuyó significativamente en todos los grupos en comparación con el grupo de solución salina.

ROTEM®: el tiempo de coagulación (TC) disminuyó significativamente tras la administración de fibrinógeno combinado con PCC o con 3F en comparación con el tratamiento con solución salina o fibrinógeno solo. Como se muestra en la Figura 2a, al final del período de observación (FIN), el TC se siguió acortando significativamente en los animales tratados con la combinación de fibrinógeno y 3F en comparación con la solución salina o el fibrinógeno solo. La combinación de fibrinógeno y PCC redujo significativamente el TC en comparación con la solución salina.

Como se muestra en la Figura 2b, la firmeza máxima del coágulo (FMC) aumentó significativamente tras la administración de fibrinógeno combinado con 3F o rhFII en comparación con el tratamiento con solución salina sola. Después de la dilución, la FMC disminuyó significativamente en la misma cantidad en todos los grupos. Después de la administración de fibrinógeno, la FMC aumentó significativamente en comparación con los animales de control tratados con solución salina. Al final del período de observación, la FMC estaba todavía significativamente aumentada en los cerdos que recibieron la combinación de fibrinógeno y concentrado de 3F (grupo de 3F) o fibrinógeno y rhFII en comparación con el grupo de solución salina.

Generación de trombina (CAT): el tiempo de retardo y el tiempo hasta el máximo no difieren dentro de los grupos. La administración de fibrinógeno combinado con PCC, rhFII o con 3F dio lugar a un valor máximo significativamente más alto que en los animales tratados solo con fibrinógeno. En comparación con el grupo de control, el valor máximo también aumentó significativamente tras la administración de fibrinógeno y rhFII, así como de fibrinógeno y 3F. Dos horas después de la lesión hepática, el valor máximo se aumentó significativamente en animales tratados con la combinación de fibrinógeno y PCC en comparación con todos los demás grupos. Los animales tratados con la combinación de fibrinógeno y rhFII, así como fibrinógeno y 3F tuvieron una PTE significativamente superior que los animales tratados solo con fibrinógeno (#), mientras que la combinación de fibrinógeno y rhFII también dio lugar a una PTE significativamente superior en comparación con el grupo de control. Al final del período de observación, la combinación de fibrinógeno y PCC tenía una PTE significativamente superior que todos los demás grupos.

CONCLUSIÓN

Como se ha demostrado anteriormente, la administración de PCC o rhFII en combinación con fibrinógeno, en comparación con la solución salina o el fibrinógeno solo, dio lugar a una reducción significativa de la pérdida de sangre tras la hemodilución normovolémica y la lesión hepática. La administración de PCC o rhFII en combinación con fibrinógeno también dio lugar a animales que vivieron significativamente más tiempo tras la lesión hepática. El tiempo de coagulación se acortó significativamente con la administración de rFII en combinación con fibrinógeno en comparación con los controles, y la firmeza máxima del coágulo también aumentó significativamente con el tratamiento de rhFII en combinación con fibrinógeno. Estos resultados demuestran que la administración de rhFII (en este caso, en combinación con fibrinógeno) es un tratamiento eficaz suficiente para restaurar la hemostasia normalizada, prevenir la pérdida de sangre y disminuir la mortalidad. El uso de rhFII en el tratamiento de trastornos hemorrágicos y la pérdida de sangre es, por lo tanto, eficaz y podría evitar las complicaciones potencialmente graves de los episodios tromboembólicos que pueden acompañar a la administración de una combinación de múltiples factores de coagulación.

Ejemplo 2

MÉTODOS

Anestesia y mantenimiento de la homeostasis: se medicaron previamente los cerdos con Dormicum (2 mg/kg) y Ketaminol (10 mg/kg) intramusculares. Tras aproximadamente 20 minutos, se insertó un catéter de polietileno (Venfion 1,0 x 32 mm, Becton Dickinson, Helsingborg, Suecia) en una vena del oído para usarlo para la administración de anestésicos y solución de Ringer. Los cerdos se anestesiaron inicialmente con pentobarbital sódico (Apoteksbolaget, Umea, Suecia), administrado por vía intravenosa como una dosis en bolo (15 mg/kg) para hacer posible la intubación. Durante el experimento, se mantuvo la anestesia con una infusión subsiguiente de pentobarbital (10-15 mg/kg/h) complementada con isoflurano al 1,8 % (Isoba® vet, Schering-Plough, Dinamarca) durante la preparación. Se ventilaron los cerdos (Servo Ventilator 900C, Siemens Elema, Solna, Suecia) con aire ambiente suministrado con O₂ al 10 %. La velocidad respiratoria se mantuvo constante a 15 ciclos/min y se mantuvo el margen final de CO₂ a ~5,5 kPa regulando el volumen corriente. Se administró solución de Ringer (Fresenius Kabi AS, Halden, Noruega) a 1,5 ml/kg/h de manera continua para reemplazar la pérdida de líquido. Se mantuvo la temperatura corporal a una temperatura de 36 a 39 °C durante todo el experimento cubriendo los animales y calentando externamente. Al final del experimento, los animales tuvieron una dosis letal de pentobarbital (> 150 mg/kg).

Preparaciones quirúrgicas: se insertó un catéter de polietileno (Intramedic PE-200 Clay Adams, Parsippany, NJ, EE.UU.) en la arteria femoral derecha para la medición continua de la presión arterial y para la recogida de muestras

de sangre. Se insertaron catéteres de polietileno (Intramedic PE-200 Clay Adams, Parsippany, NJ, EE.UU.) en ambas venas femorales para la extracción de sangre y la administración de glóbulos rojos procesados (PRC), almidón de hidroxietilo (HES) y fármaco de estudio/vehículo. Se colocó un cuarto catéter de polietileno (Intramedic PE-200 Clay Adams, Parsippany, NJ, EE.UU.) para controlar la presión venosa central (CVP) en la vena yugular derecha. Se midió la temperatura corporal mediante una sonda rectal. Finalmente, se realizó una laparotomía de la línea media, aproximadamente 35 cm, para descubrir el hígado. Hasta que se realizó la incisión del hígado, se cerró la herida con fórceps hemostáticos y se protegió del secado mediante hisopos sumergidos en solución salina.

Protocolo experimental: después de las muestras basales de sangre (BS0), se sometieron los animales a un intercambio isovolémico y normotérmico del ~60 % de su volumen sanguíneo total (70 ml/kg) con HES a 60 mg/ml (Voluven[®], Fresenius Kabi AB, Uppsala, Suecia). Se retiró la mayor cantidad posible de sangre con jeringas de 50 ml preparadas con 5 ml de citrato sódico 0,109 M, hasta que la presión arterial media (MAP) alcanzó un nivel crítico de 30 mm Hg a 35 mm Hg. A continuación, los animales se dejaron en reposo hasta que la MAP aumentó hasta un nivel estable (aproximadamente 10 minutos).

Entonces, se prosiguió con la extracción de sangre hasta que la MAP se redujo al mínimo de 30 mm Hg y se administró HES de inmediato i.v. (1 ml de HES: 1 ml de sangre) por medio de un manguito de presión. Normalmente, es difícil tomar el volumen calculado de sangre necesario para establecer la coagulopatía durante la primera serie de intercambio de sangre-HES. Si el nivel de coagulopatía, controlado con el análisis ROTEM, es demasiado bajo, se retira más sangre y se reemplaza por HES (1:1, aunque la sangre se diluye tras la primera serie de intercambio). Durante la segunda y todas las rondas siguientes, la presión arterial media no caerá por debajo de 60 mm Hg, y no hay necesidad de ninguna pausa de la recuperación. Para aumentar al máximo el volumen de sangre extraído en la primera serie de intercambio, aún cuando la MAP está cayendo, se puede administrar clorhidrato de fenilefrina (Apoteket AB, Möndal, Suecia) i.v. para exprimir la sangre de los vasos periféricos. Se administra clorhidrato de fenilefrina (aproximadamente 2 ml de 0,1 mg/ml) tras la pausa de la recuperación de 10 minutos, cuando la MAP ha caído a aproximadamente 40 mm Hg. Durante el aumento corto e inmediato de MAP, se pueden llenar algunas jeringas adicionales con sangre.

Se procesó la sangre derramada usando el programa de lavado de calidad en un dispositivo de ahorro de células (CATS[®], Fresenius Kabi AB, Uppsala, Suecia) y, tras una reanimación del volumen con HES, los animales recibieron un volumen apropiado de glóbulos rojos procesados para mantener el valor de hemoglobina por encima de 50 g/l y así evitar la muerte prematura por anemia grave. Se realizó el análisis ROTEM tras la hemodilución para determinar la extensión de la coagulopatía. Los criterios para la coagulopatía fueron los siguientes: $TC_{EX-TEM} \geq 100$ s y $FMC \leq 40$ mm. Después de la coagulopatía establecida, se recogió una muestra de sangre (BS2). A continuación, se administró el fármaco del estudio. Los fármacos de estudio correspondían a los siguientes: (1) control de solución salina; (2) FII humano recombinante (rhFII) a 8 mg/kg; (3) combinación de tres factores correspondiente a rhFII + rhFX + rhFVIIa a 4,0, 0,32 y 0,006 mg/kg, respectivamente (dosis baja); (4) combinación de tres factores correspondiente a rhFII + rhFX + rhFVIIa a 8,0, 0,64 y 0,012 mg/kg, respectivamente (dosis alta); (5) FEIBA VH[®] (complejo coagulante anti-inhibidor (AICC), Baxter) a 40 U/kg; (6) NovoSeven[®] (Factor de coagulación VIIa, Novo Nordisk) a 200 + 100 µg/kg; o Haemocomplettan[®] HS (concentrado de fibrinógeno, CSL-Behring). Diez (10) minutos después de completarse la infusión, se recogió otra muestra de sangre (BS3). Se realizó una incisión estandarizada colocando un molde de elaboración casera en el lóbulo derecho del hígado y tirando de una cuchilla quirúrgica (n.º 11) a través de una hendidura del molde (longitud de 8 cm, profundidad de 3 cm) para inducir una hemorragia incontrolada. El tiempo máximo de observación tras la incisión del hígado fue de 120 min. Justo antes de la muerte, se recogió una última muestra de sangre (BS4). Se extrajo sangre del abdomen y se determinó la pérdida total de sangre, así como el tiempo de supervivencia. La muerte se definió como la actividad eléctrica sin pulso, PAM por debajo de 15 mm Hg o margen final de dióxido de carbono inferior a 1,5 kPa.

Muestreo de sangre: se recogió sangre arterial en tubos tratados con citrato (S-Monovette[®] 9 NC/2,9 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) para las mediciones de ROTEM, y se reservó plasma para la generación de trombina y el análisis del complejo de trombina-antitrombina. Se recogió sangre para determinar la concentración en plasma de Factor II humano recombinante (rhFII), factor X humano recombinante (rhFX), FVI-la, fibrinógeno humano y recuento de células en tubos de EDTA de potasio (S-Monovette[®] 2,6 ml de K3E, Sarstedt, Nümbrecht, Alemania).

Análisis de sangre entera

ROTEM: a lo largo del experimento, se obtuvieron muestras de sangre en serie para evaluar la competencia del sistema hemostático con respecto al desarrollo de la elasticidad del coágulo mediante pruebas de coagulación convencionales (EXTEM[®], INTEM[®], Pentapharm GmbH, Munich, Alemania) en tromboelastometría rotacional (ROTEM[®], Pentapharm GmbH, Munich, Alemania). Se usaron reactivos disponibles en el mercado, excepto para la solución de cloruro de calcio, que se preparó internamente con una concentración similar a la solución comercial disponible. Se siguieron las instrucciones del procedimiento del fabricante. En este estudio, se evaluaron el tiempo de coagulación (TC), el tiempo de formación de coágulos (TFC) y la firmeza máxima del coágulo (FMC).

Gases y electrolitos en sangre: durante el experimento, se analizaron los gases de la sangre arterial, parámetros de ácido-base y electrolitos (ABL 700, Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Dinamarca). Los análisis se realizaron de

acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los animales presentaron un buen estado de gases en sangre a lo largo de los experimentos.

Recuento de células: para controlar las posibles variaciones en las concentraciones de células sanguíneas, se analizaron las muestras de sangre arterial en un instrumento de contador celular automatizado (KX-21N, Sysmex, Kobe, Japón) en todas las ocasiones de muestreo de sangre. Los análisis se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis de Plasma

Complejo de trombina-antitrombina (TAT): se midieron los niveles de TAT en plasma usando un inmunoensayo enzimático de tipo sándwich (Enzygnost® TAT micro, Dade Behring GmbH, Marburg, Alemania). Se siguieron las instrucciones del fabricante. Si se obtuvieron concentraciones > 90 µg/ml, las muestras se diluyeron 10 veces en tampón diluyente y se volvieron a analizar. Si se observaron coágulos en muestras de plasma, no se analizaron para determinar el TAT.

CAT: el ensayo de CAT se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 1.

RESULTADOS

Análisis de los datos: se recogieron la presión arterial media, la presión venosa central y los datos de la frecuencia cardíaca usando un software interno (PharmLab V6.0, AstraZeneca R&D Mölndal). Los resultados se presentan como estadística descriptiva con valores medios ± error típico de la media (ETM), excepto para los resultados del tiempo de coagulación de la sangre entera y de la concentración de TAT. Estos resultados se presentan como valores medianos, porque los valores atípicos en estos datos afectaron al valor medio de una manera engañosa. La última muestra de sangre de cada experimento, denominada "fin del experimento", se toma antes de la muerte, que se produce en diferentes momentos experimentales para la mayoría de los animales.

Pérdida de sangre: la Figura 3 muestra la pérdida de sangre por kg de peso corporal en ml tras la administración de vehículo, sustancias de ensayo y de control e incisión hepática. Los datos se muestran como valores individuales con la mediana representada por una barra horizontal.

Tiempo de supervivencia: la Figura 4 muestra las curvas de supervivencia para los diferentes grupos de tratamiento. En el grupo de vehículo, el 25 % de los animales sobrevivió durante todo el experimento. La supervivencia durante 2 h de tiempo de observación en los grupos de tratamiento fue para la dosis inferior de la combinación de tres factores del 67 %, la combinación de tres factores a la dosis superior, NovoSeven® y Haemocomplettan® del 80 %, rhFII y FEIBA® del 100 %, respectivamente

ROTEM: los resultados de la activación de EXTEM, es decir, la activación a través de TF, de muestras de sangre entera extraídas en la línea basal, tras la dilución, tras la administración del fármaco y al final del experimento se muestran en las Figuras 5a y 5b. En la línea basal, el TC y la FMC son similares para todos los grupos de tratamiento. Tras la dilución, el TC aumenta el doble del nivel basal, mientras que la FMC se reduce a aproximadamente la mitad del nivel en la línea basal. Después de la dilución, ambas variables muestran una mayor variabilidad entre los grupos en comparación con la línea basal. Después de la administración de los tratamientos, el TC para todos los tratamientos incluidos se desplazó de manera similar hacia los valores basales sin normalización completa. El efecto sobre la FMC por los diferentes tratamientos fue bajo, a excepción de Haemocomplettan® (fibrinógeno), que mostró una FMC casi normalizada tras la administración del fármaco.

CAT: en las Figuras 6 (a-d), se muestran los resultados del análisis de trombografía calibrada automatizada de muestras de plasma extraídas en la línea basal, tras la dilución, tras la administración del fármaco y al final del experimento.

Después de la dilución, el tiempo de retardo (TR) y el tiempo hasta el máximo (thMáx) se redujeron, mientras que el Máximo y el potencial de trombina endógena (PTE) aumentaron en comparación con los valores basales. Después de la administración de las sustancias, el TR aumentó aproximadamente un 50 % para el rhFII, y se observó un ligero aumento para Haemocomplettan®, mientras que las otras sustancias produjeron ligeras disminuciones del TR. Más adelante, el thMáx mostró el mismo patrón que el TR. Los valores máximos aumentaron para rhFII en un 100 %, para la combinación de tres factores (dosis baja) en un 30 %, para la combinación de tres factores (dosis alta) en un 150 % y para la FEIBA® en un 150 % en comparación con el valor tras la dilución. El vehículo, NovoSeven® y Haemocomplettan® no cambiaron el Máximo en comparación con el valor inmediatamente posterior a la dilución. Finalmente, los valores de PTE se aumentaron en casi un 200 % para rhFII, para la combinación de tres factores (dosis alta) y para FEIBA® en comparación con los valores posteriores a la etapa de dilución. La PTE para la combinación de tres dosis de dosis baja se aumentó en aproximadamente un 30 % en comparación con la dilución posterior.

Al final del experimento, el TR correspondía al mismo período de tiempo que tras la administración de la dosis, con

la excepción de que RhFII había disminuido hasta el mismo nivel que tras la etapa de dilución. Los valores de thMáx fueron como para el TR. La situación para el Máximo mostró que todos los grupos de sustancias, a excepción de FEIBA[®] habían vuelto al nivel encontrado una vez finalizada la dilución. FEIBA[®] aún mostró un Máximo comparable al nivel encontrado inmediatamente después de la administración de la sustancia. Los valores de PTE al final del experimento eran todos similares al patrón del máximo.

TAT: como se muestra en la Figura 7, los niveles de TAT fueron similares en todos los grupos de tratamiento tras la etapa de dilución. Cuando se habían administrado fármacos, se observó un aumento en los niveles de TAT entre 2-3 veces para todos los tratamientos que contenían protrombina, es decir, las combinaciones de tres factores, rhFII y FEIBA[®]. Al final del experimento, el patrón obtenido tras la administración del fármaco seguía siendo uniforme, con un aumento aún mayor en los niveles de TAT para los tratamientos que contenían protrombina excepto para rhFII solo, que mostró un nivel de TAT reducido en comparación con el valor posterior a la administración. Haemocompletan[®] y NovoSeven[®] también habían aumentado los niveles de TAT al final del experimento en comparación con tanto después de la dilución como después de la administración por un factor de 2 a 3.

CONCLUSIÓN

Como se ha demostrado anteriormente, la administración de rhFII solo, en comparación con la solución salina u otros tratamientos, dio lugar a una reducción significativa de la pérdida de sangre tras la hemodilución normovolémica y la lesión hepática. Los análisis de trombografía revelaron un aumento en el tiempo de retardo del aproximadamente 50 % para rhFII solo, y un aumento del valor del Máximo para rhFII solo en un 100 % y un aumento en el valor de PTE para rhFII solo en casi el 200 %. Estos resultados demuestran además que la administración de rhFII solo es un tratamiento eficaz suficiente para restablecer la hemostasia normalizada, prevenir la pérdida de sangre y aumentar el tiempo de supervivencia.

El uso de rhFII solo o el uso de la combinación de tres factores no se han probado previamente en un modelo animal complejo de hemorragia no controlada debida a la coagulopatía por dilución. Por lo tanto, la presente invención, proporciona por primera vez la eficacia de rhFII solo o la eficacia de 3F para el tratamiento de trastornos hemorrágicos y la pérdida de sangre. Como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior, los niveles de TAT y los datos de generación de trombina al final del experimento se redujeron hasta los niveles previos a la administración para todas las muestras. Para la administración de factores de coagulación tales como el rhFII solo, esto puede ser ventajoso, ya que permite una mejor modulación de un régimen de tratamiento en el transcurso del episodio hemorrágico crítico o período de pérdida de sangre. Un período de mayor duración puede no permitir los ajustes necesarios en los regímenes de tratamiento. Además, la administración de rhFII solo, como se ha descrito anteriormente, puede evitar, durante el tratamiento, las complicaciones potencialmente graves de los episodios tromboembólicos que, a veces, acompañan a la administración de una combinación de múltiples factores de coagulación.

REIVINDICACIONES

1. Un tratamiento mediante factor de coagulación que consiste en:

- 5 (1) FII;
- o (2) una combinación de FII, FVIIa y FX; o
- (3) fibrinógeno y una combinación de FII, FVIIa y FX; o
- (4) fibrinógeno y FII;
- o (5) FII y FVIIa;
- 10 o (6) fibrinógeno, FII y FVIIa;

para su uso en la normalización de la hemostasia alterada asociada con una coagulopatía por dilución en un mamífero que lo necesita.

15 2. Un tratamiento mediante factor de coagulación que consiste en:

- (1) FII;
- o (2) una combinación de FII, FVIIa y FX; o
- 20 (3) fibrinógeno y una combinación de FII, FVIIa y FX; o
- (4) fibrinógeno y FII;
- o (5) FII y FVIIa;
- o (6) fibrinógeno, FII y FVIIa;

25 para su uso en el aumento de la firmeza máxima del coágulo (FMC) en un mamífero que tiene hemostasia alterada asociada con una coagulopatía por dilución.

3. Un tratamiento mediante factor de coagulación que consiste en:

- (1) FII;
- 30 o (2) una combinación de FII, FVIIa y FX; o
- (3) fibrinógeno y una combinación de FII, FVIIa y FX; o
- (4) fibrinógeno y FII;
- o (5) FII y FVIIa;
- 35 o (6) fibrinógeno, FII y FVIIa;

para su uso en la reducción del tiempo de coagulación (TC) en un mamífero que tiene hemostasia alterada asociada con una coagulopatía por dilución.

4. Un tratamiento mediante factor de coagulación que consiste en:

- 40 (1) FII;
- o (2) una combinación de FII, FVIIa y FX; o
- (3) fibrinógeno y una combinación de FII, FVIIa y FX; o
- (4) fibrinógeno y FII;
- 45 o (5) FII y FVIIa;
- o (6) fibrinógeno, FII y FVIIa;

50 para su uso en la mejora de la generación de trombina en un mamífero que tiene hemostasia alterada asociada con una coagulopatía por dilución.

5. El tratamiento mediante factor de coagulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el FII es rhFII y se administra a una dosis de 1 a 10 mg/kg.

55 6. El tratamiento mediante factor de coagulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha hemostasia alterada asociada con una coagulopatía por dilución se asocia con una pérdida masiva de sangre, tal como una pérdida masiva de sangre asociada con una coagulopatía, una hemorragia o un episodio de hemorragia por traumatismo, tal como el asociado con la hemorragia periquirúrgica, la hemorragia postquirúrgica o la hemorragia postparto.

60 7. El tratamiento mediante factor de coagulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho FII, FVIIa o FX son FII humano recombinante (rhFII), FVIIa recombinante (rhFVIIa) o FX recombinante (rhFX).

65 8. El tratamiento mediante factor de coagulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el mamífero que necesita el tratamiento tiene un nivel de concentración de fibrinógeno en sangre

inferior a aproximadamente 2 g/l, inferior a aproximadamente 1 g/l, inferior a aproximadamente 0,5 g/l, inferior a aproximadamente 200 mg/dl, inferior a aproximadamente 150 mg/dl, inferior a aproximadamente 100 mg/dl o inferior a aproximadamente 50 mg/dl g/l.

- 5 9. El tratamiento mediante factor de coagulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicha hemostasia afectada está asociada con una pérdida de sangre superior al aproximadamente 30 %, superior al aproximadamente 40 %, superior al aproximadamente 50 %, superior al aproximadamente 60 %, superior al aproximadamente 70 %, superior al aproximadamente 80 % o superior al aproximadamente 85 % del volumen en sangre total estimado de un mamífero.
- 10 10. El tratamiento mediante factor de coagulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha coagulopatía por dilución se debe al restablecimiento de la normovolemia o la estabilización hemodinámica.
- 15 11. El tratamiento mediante factor de coagulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el fibrinógeno se administra en una cantidad suficiente para elevar la concentración de fibrinógeno en sangre por encima de aproximadamente 0,5 g/l, por encima de aproximadamente 1 g/l, por encima de aproximadamente 1,5 g/l o por encima de aproximadamente 2 mg/l.
- 20 12. El tratamiento mediante factor de coagulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el fibrinógeno se administra a una dosis de 12,5 a 200 mg/kg.
- 25 13. El tratamiento mediante factor de coagulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el tratamiento mediante factor de coagulación se administra a una dosis que reduce el tiempo de coagulación en de aproximadamente 40 segundos a aproximadamente 60 segundos, que aumenta la firmeza máxima del coágulo hasta de aproximadamente 10 mm a aproximadamente 30 mm y/o que da lugar al mantenimiento de la coagulación normalizada durante al menos dos horas después de la administración.
- 30 14. El tratamiento mediante factor de coagulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que dicho tratamiento mediante factor de coagulación es (2) la combinación de FII, FVIIa y FX, o (3) la combinación de FII, FVIIa y FX con fibrinógeno; y en el que FII y FVIIa se administran en una proporción de al menos 1:90.
- 35 15. El tratamiento mediante factor de coagulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que dicho tratamiento mediante factor de coagulación es (1) FII o (4) fibrinógeno y FII.

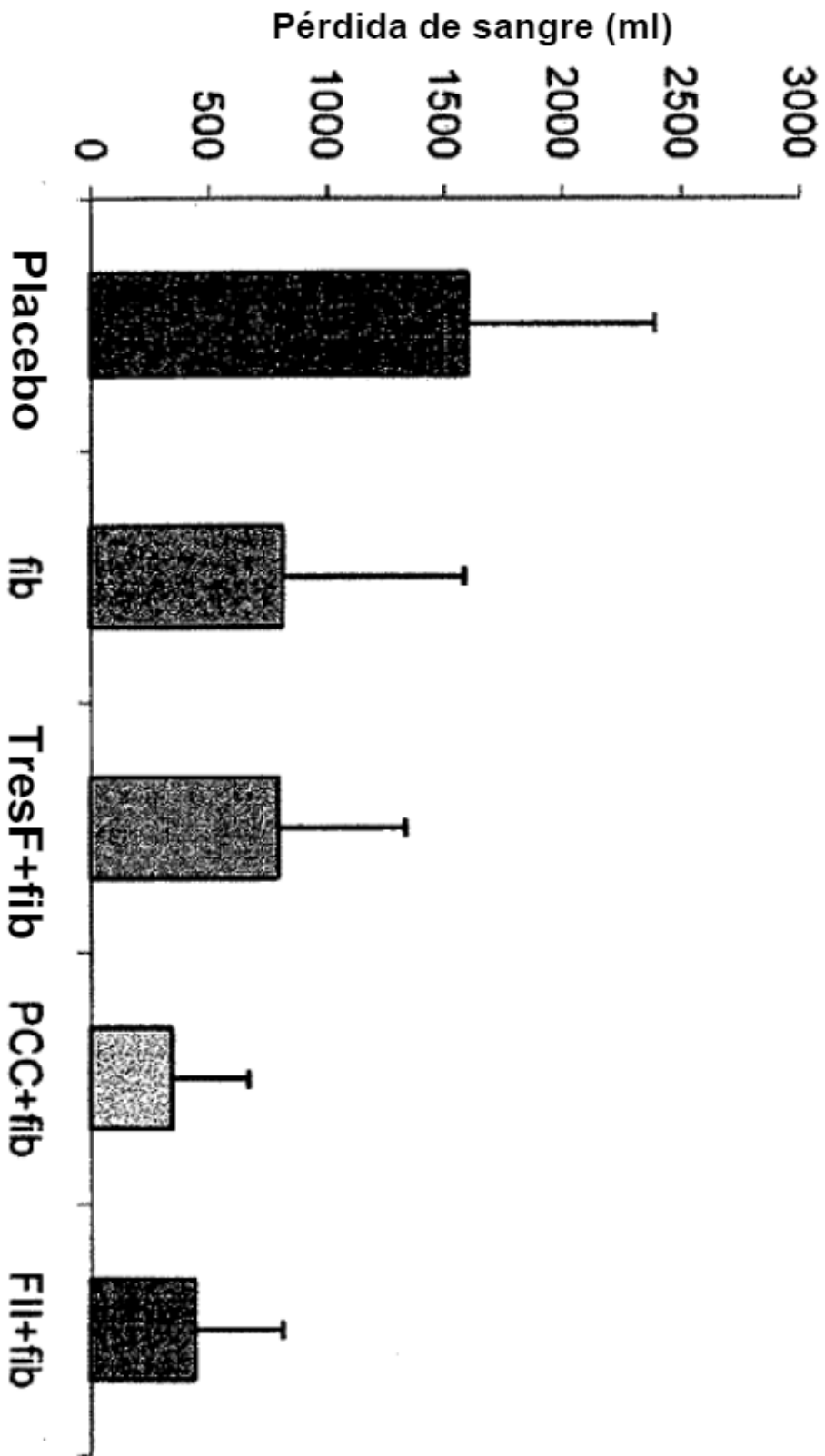


Figura 1

Figura 2A

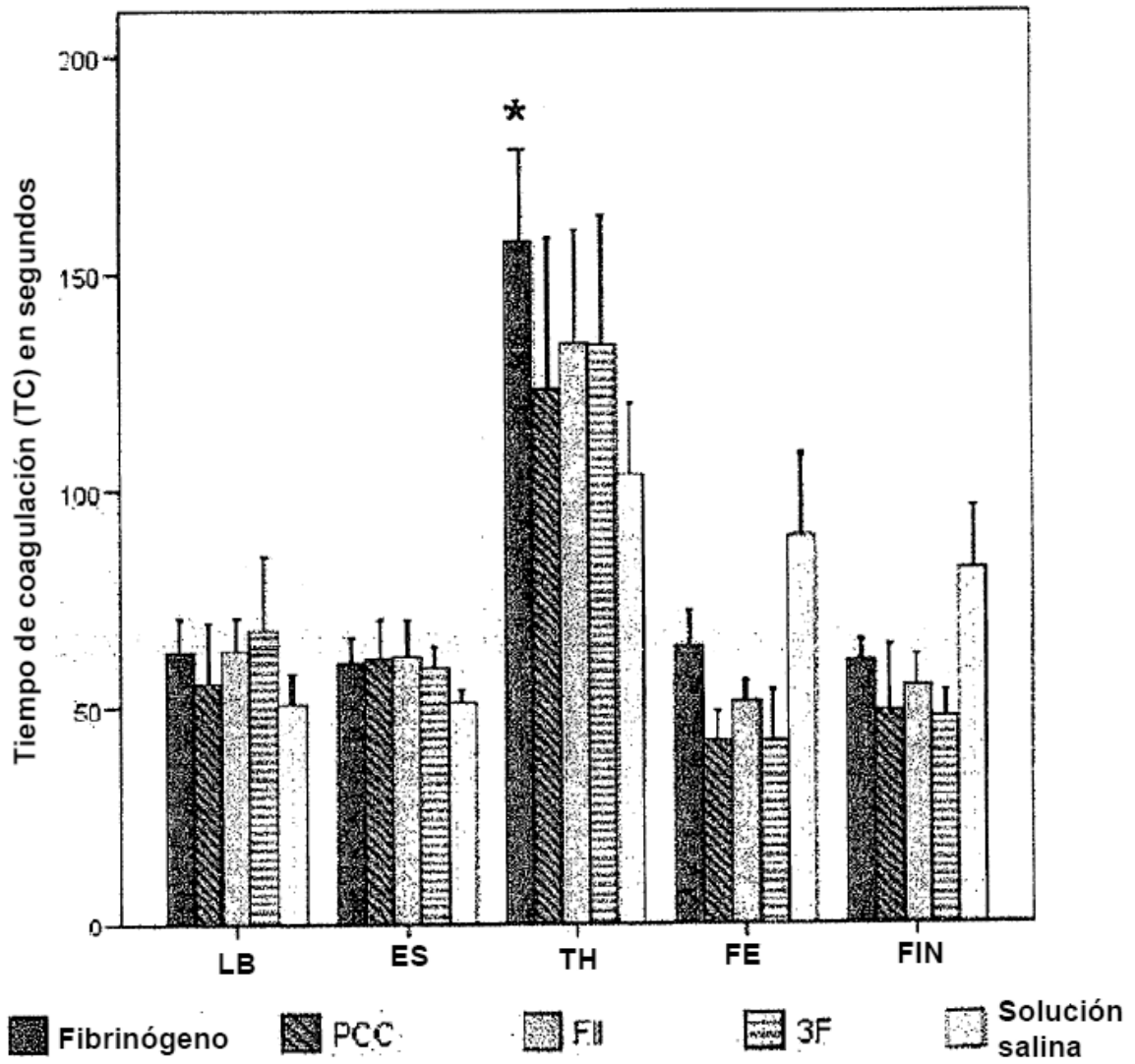
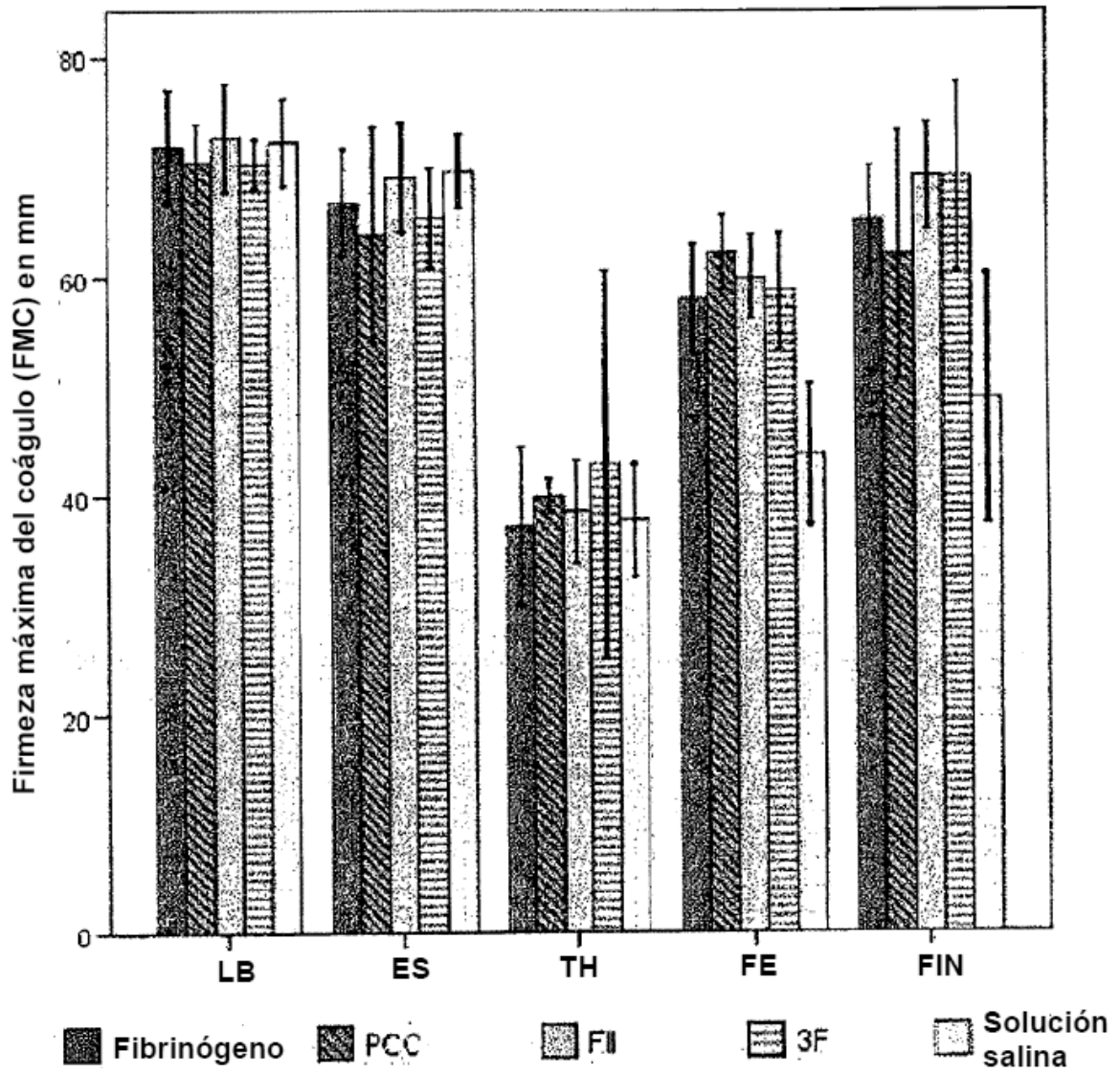


Figura 2B



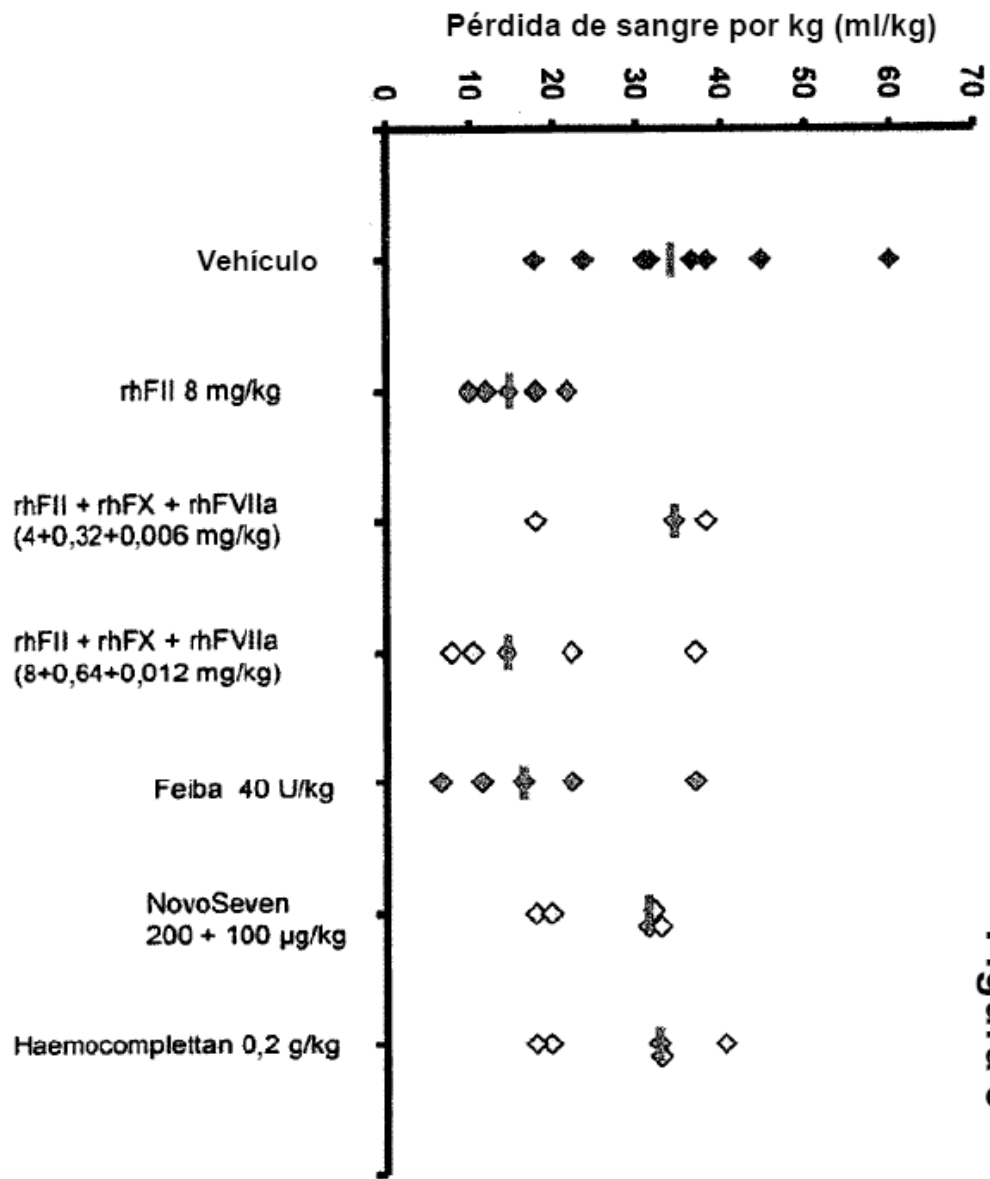


Figura 3

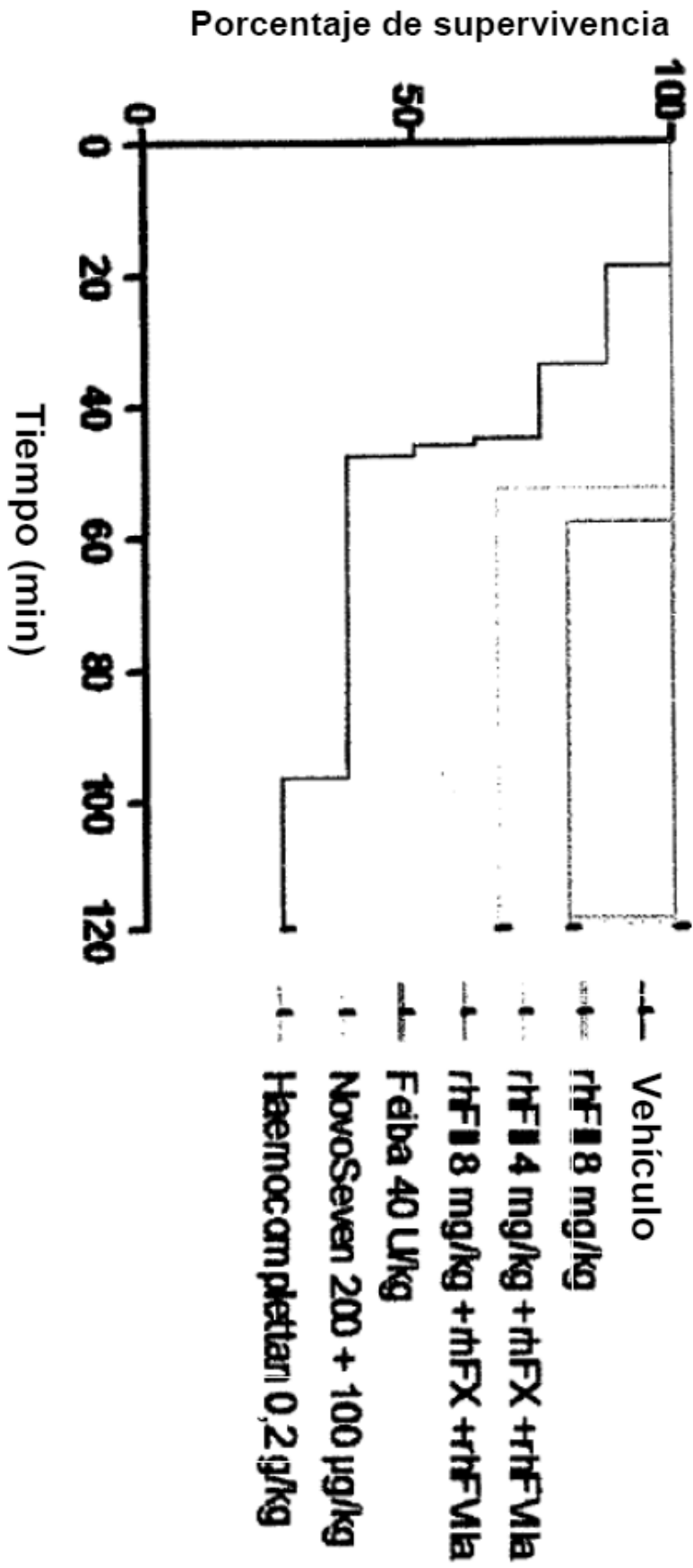


Figura 4

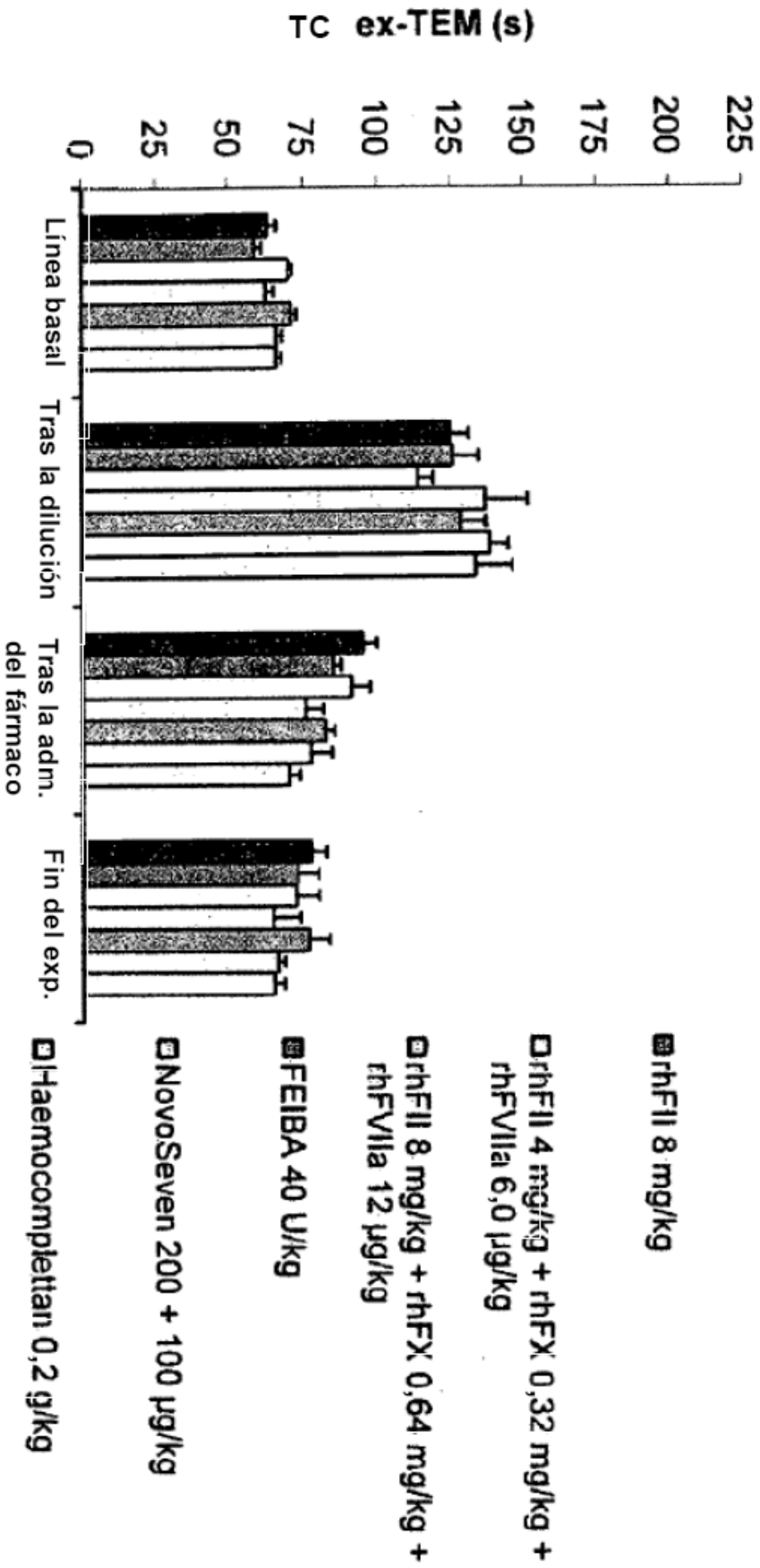


Figura 5A

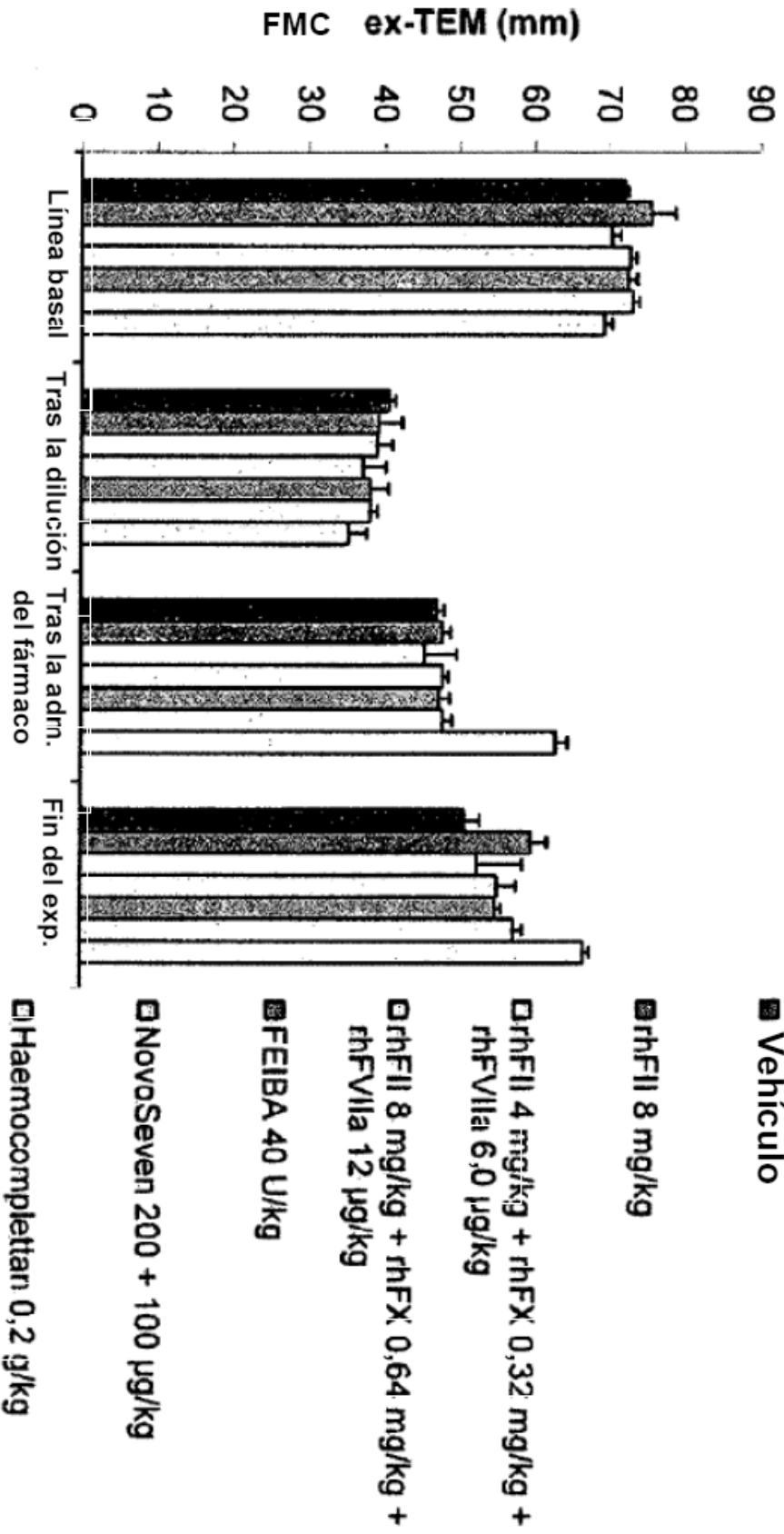
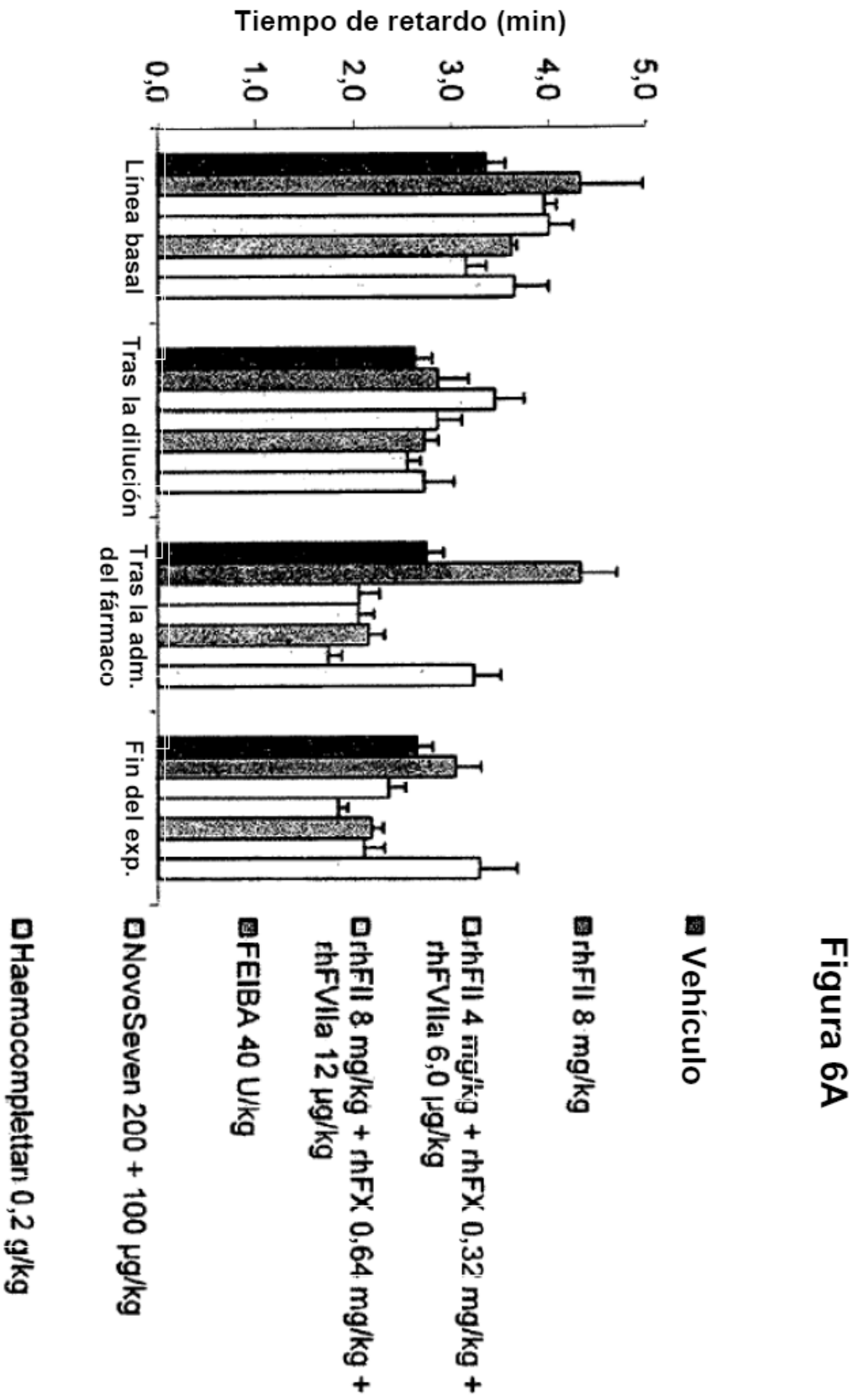
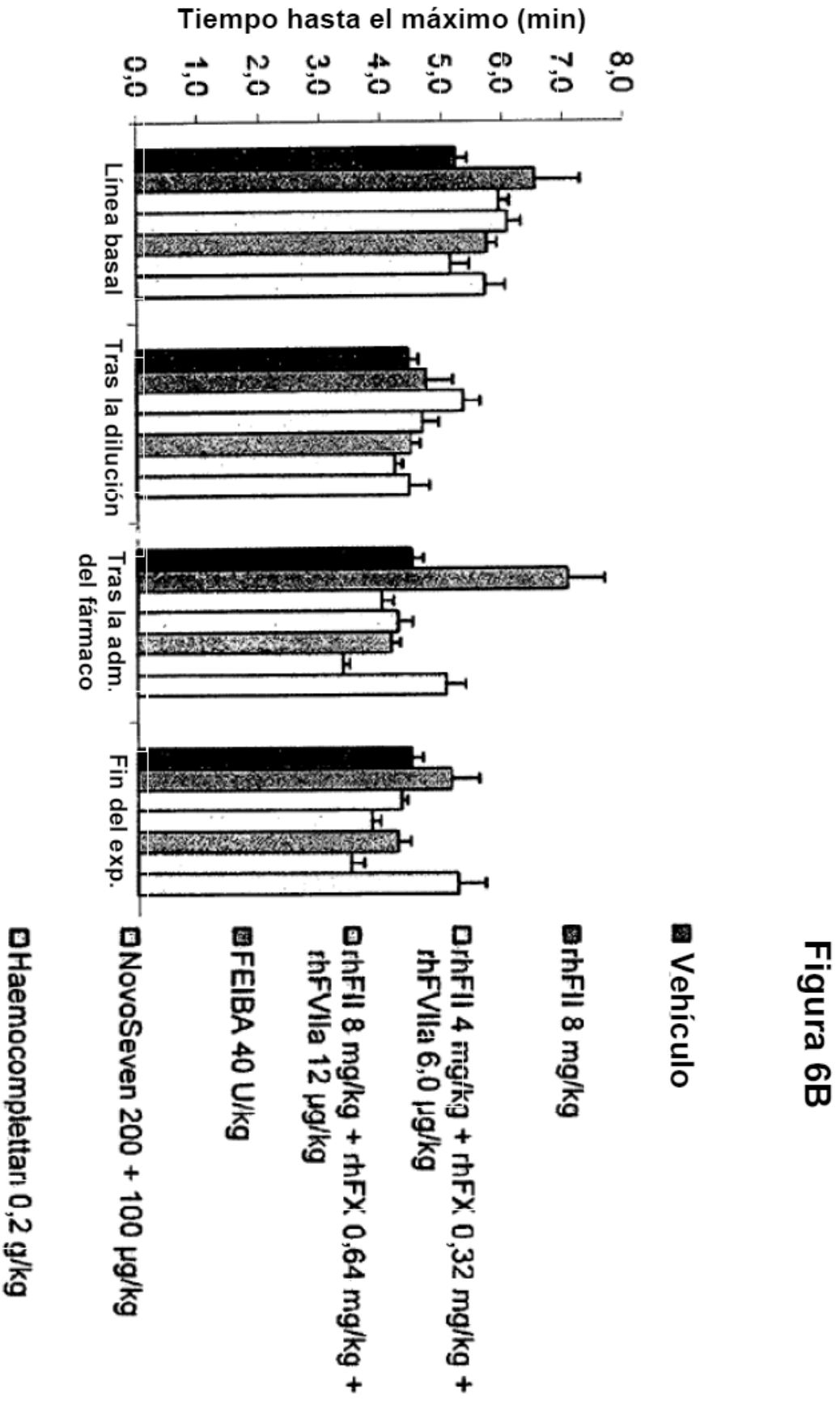
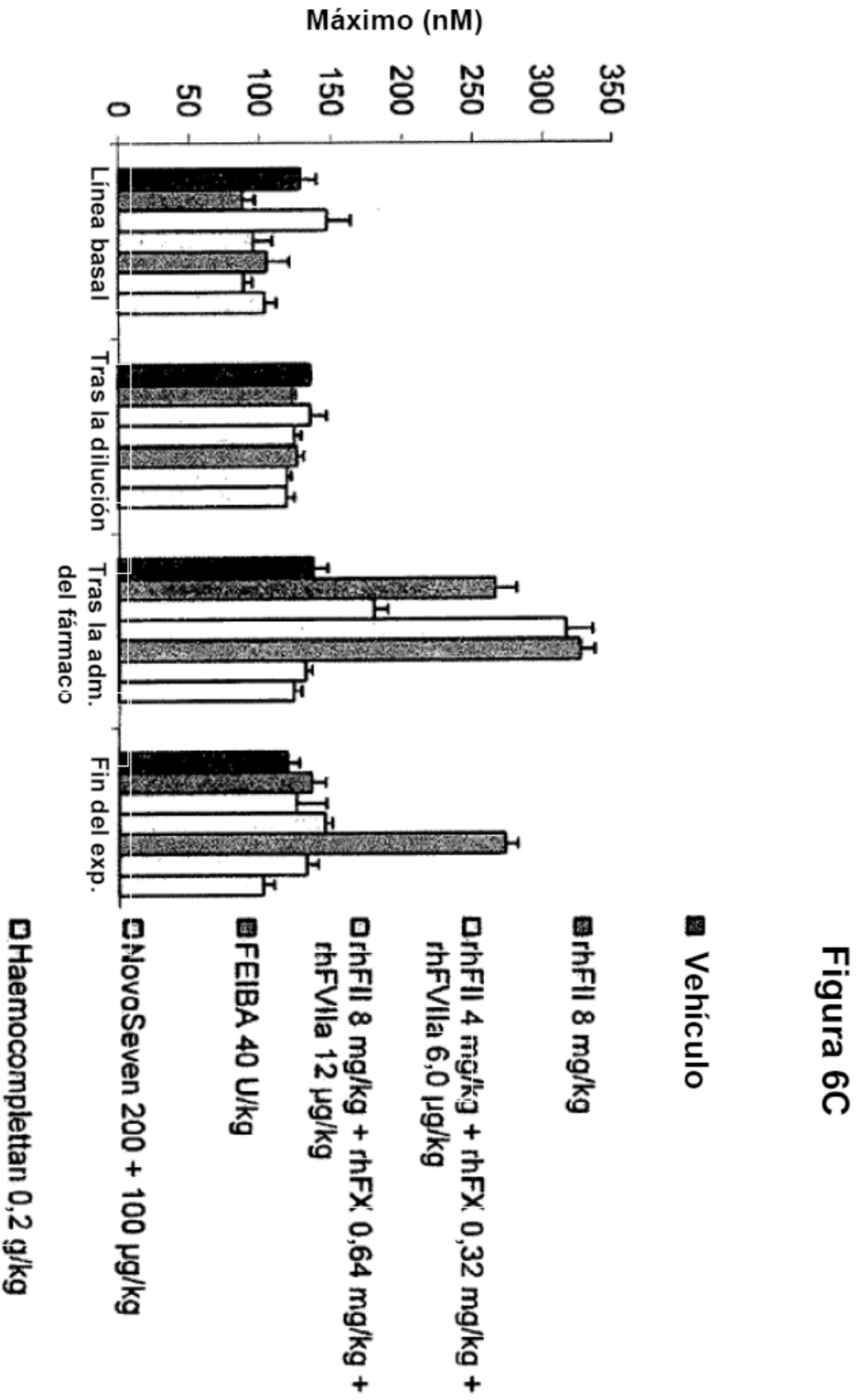
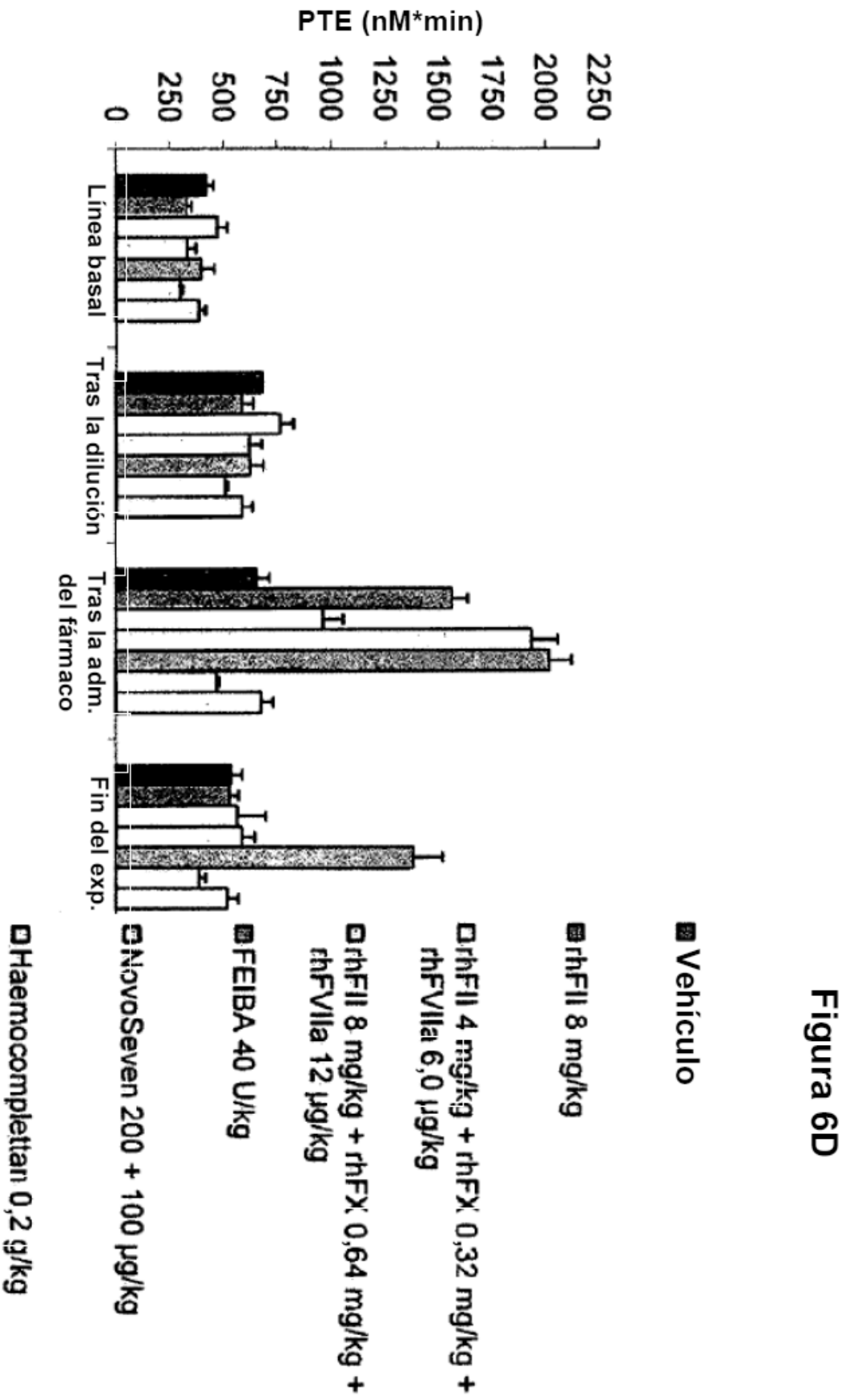


Figura 5B









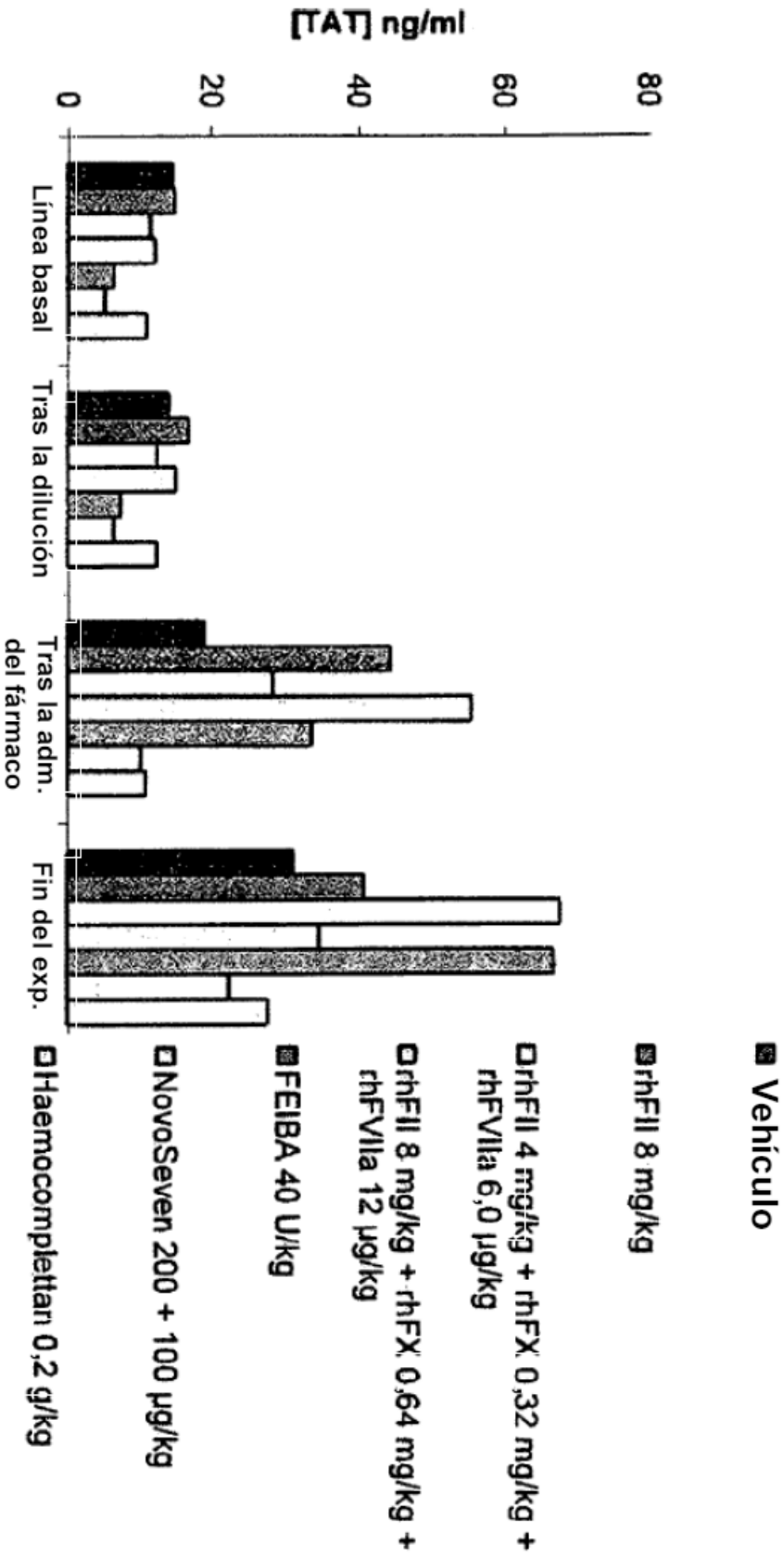


Figura 7